

Treball de Fi de Grau
Grau en Enginyeria Química

**Plataformes bioactives integrades per a l'alliberació i
detecció de dopamina**

MEMÒRIA

Autor: Alessia Giménez Rodríguez

Director: Carlos Alemán Llansó

Codirectora: Georgina Fabregat Jové

Convocatòria: Setembre 2016



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Industrial de Barcelona



Resum

El present estudi pretén ampliar els coneixements en l'àmbit dels hidrogels com a vector de subministrament de fàrmacs que actualment requereixen de tècniques agressives pel pacient. Un hidrogel (HG) es defineix com una xarxa polimèrica que té la propietat d'absorbir elevats volums de dissolvent provocant canvis macroscòpics en les seves dimensions[15]. En aquest estudi s'ha seleccionat l'àcid γ -poliglutàmic (PGGA) com a polímer combinat amb cistamina (AED) com agent entrecreuant. Com a fàrmac s'ha seleccionat la dopamina (DA), una monoamina produïda de forma natural, la qual s'incorporarà en l'estructura dels hidrogels degut al seu paper protagonista en diverses malalties degeneratives que afecten la població i que es poden pal·liar mitjançant un subministrament controlat del producte.

Un cop seleccionades les condicions òptimes de síntesi de l'hidrogel per dur a terme exitosament el procés d'incorporació i alliberació de DA, es procedeix a la incorporació d'aquest en la superfície d'un elèctrode serigrafiat de carboni (ESC) modificat amb un recobriments de poli(3,4-etilendioxitiòfè) (PEDOT) obtingut electroquímicament. La principal finalitat d'aquesta incorporació és l'obtenció d'un dispositiu capaç d'alliberar DA al medi, portada a terme per part de l'hidrogel, i simultàniament detectar les concentracions de DA alliberada mitjançant el recobriments de PEDOT.

Els diferents HPGGAs i el dispositiu final han sigut caracteritzats principalment mitjançant tècniques d'espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier (TF-IR), espectroscòpia UV-vis, microscòpia electrònica de rastreig (MER) i tècniques electroquímiques. Per altra banda, diversos assajos per tal d'optimitzar el procés d'incorporació i alliberació de DA han sigut realitzats, analitzant factors com el pH del medi, el grau d'entrecreuament o el pes molecular del PGGA ja que tots ells afecten al grau d'inflament de l'hidrogel i consegüentment al perfil d'alliberació del fàrmac.

Sumari

RESUM	3
SUMARI	4
1. GLOSSARI	7
2. INTRODUCCIÓ	9
2.1. Catecolamines	9
2.1.1. Dopamina	9
2.1.1.1. Oxidació de la dopamina.....	10
2.1.2. Concentracions anòmales i trastorns associats	11
2.1.3. Determinació i subministrament de DA en pacients.....	12
2.2. Polímers conductors	13
2.2.1. Poli(3,4-etilendioxitiòfè)	13
2.3. Hidrogels	15
2.3.1. Àcid γ -glutàmic	16
3. OBJECTIUS	18
4. PART EXPERIMENTAL	20
4.1. Materials.....	20
4.2. Equips	20
4.2.1. Espectròmetre d'Infraroig per Transformada de Fourier (TF-IR)	20
4.2.2. Espectròmetre d'ultraviolat i visible (UV-Vis)	21
4.2.3. Microscopi digital	21
4.2.4. Microscopi electrònic de rastreig (MER)	21
4.2.5. Potenciostat	21
4.3. Mètodes	23
4.3.1. Hidrogels d'àcid γ -poliglutàmic (HPGGA) en pastilla	23
4.3.1.1. Preparació i caracterització de HPGGA	23
4.3.1.1.1. Anàlisi dels HPGGA mitjançant Espectroscopia Infraroja amb Transformada de Fourier (TF-IR)	25
4.3.1.2. Determinació del grau d'inflament en funció del grau d'entrecreuament, pes molecular del PGGA i tipus de carbodiimida.....	25
4.3.1.2.1. Determinació del grau d'inflament en funció del pH del medi.....	26

4.3.1.3. Incorporació i alliberació de dopamina	27
4.3.1.3.1 Incorporació de DA.....	27
4.3.1.3.1.1 Determinació de la presència de DA mitjançant Espectroscòpia Infraroja per Transformada de Fourier (TF-IR).....	27
4.3.1.3.1.2 Determinació de la concentració de DA incorporada en HPGGA.....	28
4.3.1.3.2 Alliberació de DA.....	29
4.3.2. Elèctrode de carboni modificat amb PEDOT- HPGGA com sistema d'alliberació i detecció simultània	29
4.3.2.1. Preparació i caracterització de l'elèctrode serigrafiat de carboni (ESC) modificat amb PEDOT i HPGGA	29
4.3.2.1.1 Elèctrode serigrafiat de carboni (ESC).....	30
4.3.2.1.2 Preparació del film de PEDOT en ESC.....	31
4.3.2.1.3 Preparació del HPGGA en ESC-PEDOT	31
4.3.2.2. Incorporació i alliberació de DA	32
4.3.2.2.1 Determinació de la concentració de DA incorporada en HPGGA.....	32
4.3.2.2.2 Alliberació de DA	33
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ	36
5.1. Hidrogels d'àcid γ -poliglutàmic.....	36
5.1.1. Influència de la concentració de cistamina, carbodiimida i pes molecular de l'àcid γ -poliglutàmic en el procés d'entrecreuament.....	36
5.1.2. Inflament dels hidrogels en funció del pH del medi i concentració iònica del medi	40
5.1.3. Estudis d'incorporació i alliberament de dopamina des dels HPGGA	45
5.1.3.1. Estudi preliminar en la incorporació de la DA.....	45
5.1.3.1.1 Determinació de la concentració de DA.....	46
5.1.3.2. Alliberament de DA en funció del pH del medi	46
5.1.3.2.1 Determinació de l'alliberament de DA en medi àcid.....	48
5.2. Elèctrode serigrafiat de carboni modificat amb PEDOT/GA/HPGGA	50
5.2.1. Selecció de les condicions experimentals òptimes per la preparació del	

HPGGA	50
5.2.1.1. Determinació del grau d'entrecreuament	52
5.2.1.2. Caracterització morfològica de HPGGA	53
5.2.2. Selecció del mètode de preparació del film de PEDOT	55
5.2.2.1. Caracterització morfològica del film PEDOT	56
5.2.3. Determinació de les propietats electroquímiques de l'elèctrode modificat	57
5.2.4. Estudis d'incorporació i alliberament de DA	59
5.2.4.1. Sensibilitat i límit de detecció de l'elèctrode modificat	63
6. ESTUDI ECONÒMIC	66
6.1. Cost de personal	66
6.2. Cost de lloguer d'equips	66
6.3. Cost de reactius i materials	67
6.4. Cost total del projecte	68
7. IMPACTE AMBIENTAL	70
7.1. Consum energètic i emissions	70
7.2. Tractament de residus generats	70
CONCLUSIONS	71
FUTURS ESTUDIS	73
AGRAÏMENTS	74
BIBLIOGRAFIA	75

1. Glossari

Abreviatures i símbols

AED	Cistamina
CSA	Carbodiimida
DA	Dopamina
EDOT	3,4-etilendioxitiofè
ESC	Elèctrode serigrafiat de carboni
GA	Gelatina porcina tipus A
HG	Hidrogel
HPGGA	Hidrogel d'àcid γ -poliglutàmic
HPGGA-i.X	i=pes molecular del polímer; X=grau d'entrecreuament
MER	Microscòpi electrònic de rastreig
PBS	Solució tampó fosfatada (phosphate buffer solution)
PEDOT	Poli (3,4-etilendioxitiofè)
Q	Grau d'inflament
TF-IR	Espectròmetre d'infraroig per transformada de Fourier

CAPÍTOL 2. INTRODUCCIÓ

2. Introducció

2.1. Catecolamines

Les catecolamines són un grup de neurotransmissors transportats pel torrent sanguini i per les esquerdes sinàptiques. Aquest grup està format per l'adrenalina, noradrenalina i la dopamina, entre d'altres; totes sintetitzades a partir de la tirosina.

Les catecolamines presenten una estructura formada per un grup catecol (orto-dihidroxibenzè) i un grup amina terminal.

2.1.1. Dopamina

La dopamina (DA) ($C_6H_3(OH)_2-CH_2-CH_2-NH_2$) és una feniletilamina (monoamina) produïda de forma natural en el cos humà que actua com a neurotransmissor en el sistema nerviós central. La **Figura 1** mostra l'estructura de la molècula [9][10].

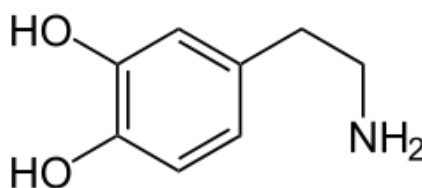


Figura 1. Estructura d'una molècula de dopamina

Aquesta és produïda en la substància negra: àrea del mesencèfal que forma part del sistema dels ganglis basals. També es produeix i allibera en l'hipotàlem, podent-se classificar com a neurohormona [9].

La dopamina també pot ser subministrada com un fàrmac que actua sobre el sistema nerviós simpàtic. Al ser una substància que no pot travessar la barrera hematoencefàlica no afecta directament al sistema nerviós central [9].

El neurotransmissor es sintetitza a partir de la L-tirosina i l'acció seqüencial de la tirosina hidròxila (TH) i L-aminoàcid descarboxilasa (AADC). Per obtenir la L-dopa cal que la tirosina s'hidroxili mitjançant l'acció de la TH amb el requeriment del cofactor BH_4 .

En la següent **Figura 2** s'esquematitza aquest procés.

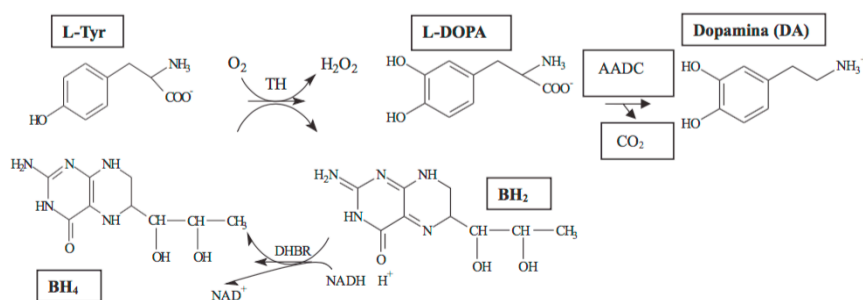


Figura 2. Esquema del procés de síntesi de la DA a partir de la L-tirosina

2.1.1.1. Oxidació de la dopamina

Les molècules de DA pateixen un procés de degradació anomenat estrès oxidatiu. L'estrès oxidatiu és un fenomen biològic que succeeix quan s'incrementa excessivament la producció de radicals lliures o espècies reactives d'oxigen i nitrogen i disminueixen els sistemes antioxidants endògens. Aquesta pèrdua del balanç oxidació-reducció provoca un augment de l'oxidació de la DA. Aquesta via de metabolització de la DA origina una sèrie de molècules que són potencialment tòxiques si l'organisme no les elimina correctament: quinones de dopamina, radicals súper òxids i peròxid d'hidrogen.

Les quinones, producte de l'oxidació dels grups alcohol que presenten els fenols, mostren deficiència d'electrons. Aquest fet provoca l'autooxidació de la molècula en orto-quinones i para-quinones sent més abundant les primeres, inestables i reactives. L'organisme produeix de forma natural les dues formes de quinones, però durant l'estrès oxidatiu augmenta la generació d'aquests compostos, els quals no poden ser reduïts per les defenses antioxidants per mantenir l'equilibri d'oxidació-reducció en la substància negra. Això provoca la neurodegeneració present en malalties com el Parkinson [7], [8].

La DA també sofreix un procés oxidatiu encara que no es produeixi a nivell biològic. Durant l'oxidació es produeixen canvis de color passant de blanc a negre passant per tons groguencs, rosats i marrons tal i com es pot observar en la següent **Figura 3**. En la **Figura 4** es pot seguir la ruta oxidativa que pateixen les molècules de DA, fet que dóna lloc als viratges de color durant el procés.

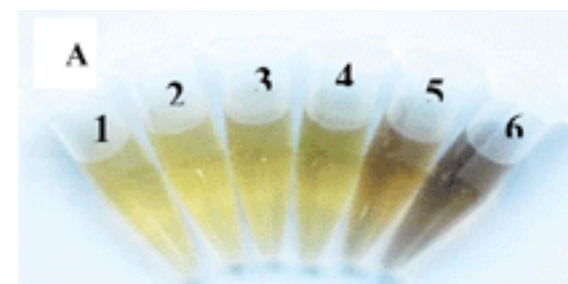


Figura 3. Canvis de coloració durant el procés d'oxidació de DA

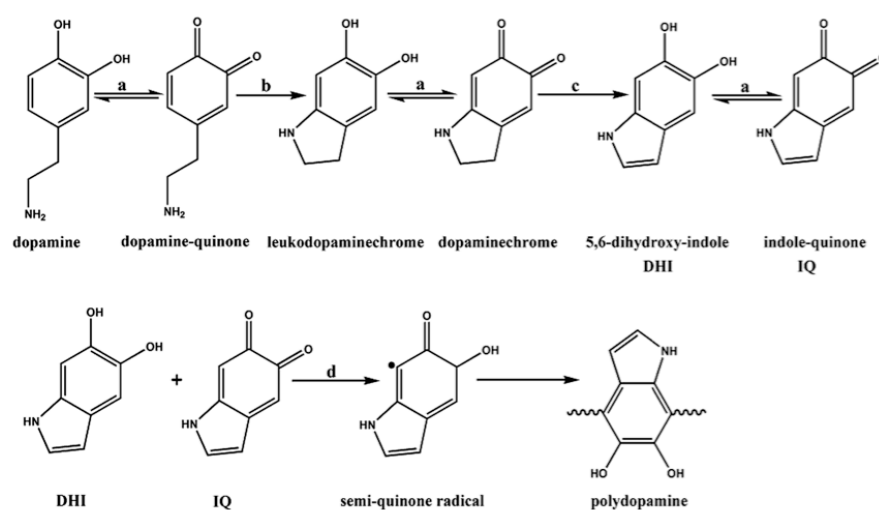


Figura 4. Ruta oxidativa de la DA

2.1.2. Concentracions anòmales i trastorns associats

La DA duu a terme funcions neuronals relacionades amb el comportament, la cognició, l'atenció i els cicles de son, principalment. Variacions anormals en les concentracions de dopamina en el flux sanguini de forma permanent, tant sigui per dèficit com per excés, provoquen trastorns psicològics i motors relacionats amb la sensació de recompensa, les emocions i la pèrdua del control postural. Aquestes concentracions anòmales poden ser causa del mal funcionament dels òrgans que secreten el neurotransmissor, però el consum de drogues pot ser font del mateix problema. La cocaïna i les amfetamines són les principals drogues que afecten a l'alliberació de DA.

La cocaïna bloqueja el transport del neurotransmissor inhibint la quantitat subministrada a les neurones. Per poder equilibrar el canvi l'organisme secreta una quantitat de DA superior

a la normal. En canvi, les amfetamines tenen una estructura similar a la DA. Aquest fet els hi permet entrar a la neurona a través dels transportadors de DA, els quals no troben diferències entre ambdues. En el moment en que l'amfetamina entra a la neurona força l'expulsió de la DA de les seves vesícules d'emmagatzematge provocant un augment del sentiment de benestar, fet que condueix a l'addicció de l'estupefaent [7], [10].

El Parkinson és una malaltia neurodegenerativa crònica en la que el dolent experimenta tremolors incontrolables en les extremitats, rigidesa muscular i pèrdua de la posició corporal. Nombrosos estudis reporten el dèficit de DA a una de les causes d'aquest síndrome. La reducció en la concentració de DA es deu a la degeneració de les neurones dopaminogèniques pigmentades generades a la substància negra. Aquest fet provoca la pèrdua de control sobre el sistema motriu. L'estrès oxidatiu és la principal causa de la neurodegeneració progressiva de la substància negra.

Un altre trastorn relacionat amb els nivells anòmals de DA són els denominats trastorns bipolars. A diferència del Parkinson, aquests es caracteritzen per mostrar altes concentracions del neurotransmissor. Aquest es genera en la zona de l'hipotàlem i té efectes sobre el sistema de recompensa i motivació. Els afectats pels trastorn bipolar presenten alts nivells d'àcid homovalínic (metabòlit de la dopamina) en els episodis psicòtics i maníacs. En els episodis de depressió aquests nivells cauen per sota de les concentracions d'equilibri. El consum de drogues citat anteriorment pot provocar episodis psicòtics ja que tots dos presenten altes concentracions de DA [7], [10].

La DA i els seus metabòlits són uns bons marcadors per detectar precoçment trastorns psicològics i neurodegeneratius. Una correcta subministració de la monoamina pot prevenir i/o millorar trastorns augmentant la qualitat de vida dels pacients.

2.1.3. Determinació i subministrament de DA en pacients

A dia d'avui la determinació de DA es duu a terme mitjançant la tècnica d'HPLC principalment. També s'utilitzen mètodes electroquímics per la seva determinació, tot i ser menys freqüent. El principal problema que presenten aquestes tècniques és l'ús de materials nobles que encareixen els procediments tals com l'or o el platí. En aquest estudi es proposen els polímers conductors com alternativa a la detecció electroquímica. Aquests disminueixen els costos del procés i són aptes per l'objectiu esmentat.

Actualment el mètode de subministrament de DA més generalitzat és mitjançant pastilles

(p.e. Largactil®, comercialitzat com Thorazine® a E.E.U.U, o Etumina®). Aquest tipus de subministrament presenta diversos inconvenients. El fet d'haver de seguir una estricta planificació en la presa de la medicació dificulta el tractament. D'altra banda, amb els comprimits la DA té una vida mitja de vida intermèdia.

Una altra forma de subministrament, tot i ser menys freqüent, és per via intravenosa. Aquesta opció també presenta desavantatges: depenent de la farmacopea el producte s'ha de diluir. A més, sempre s'ha de fer servir material mèdic extra o la necessitat d'una segona persona per la injecció o d'assistència mèdica. En aquest estudi es proposen els hidrogels com alternativa al mètode actual de subministrament ja que aquestes estructures posseeixen característiques que els fan aptes per l'alliberament controlat del fàrmac desitjat.

No s'ha d'oblidar que en la gran majoria dels tractaments psiquiàtrics es treballa amb la tècnica de prova i error en les quantitats subministrades als pacients ja que, cada persona reacciona diferent als fàrmacs i no és senzill saber quines són les millors condicions per cada tractament [11].

2.2. Polímers conductors

Típicament els polímers convencionals han estat plàstics, gomes, etc. oferint una resistència significant a la conducció elèctrica. Amb la invenció del poliacetilè com a conductor en la dècada dels 70 els polímers conductors van començar a rebre atenció per part de la comunitat científica. Les característiques que van fer aquest material tan atractiu, i ho segueixen aconseguint, són l'ampli rang de conductivitat elèctrica que es pot aconseguir dopant el material a diferents nivells mentre es manté la flexibilitat i l'alta termoestabilitat del polímer.

Gairebé tots els polímers conjugats poden ser parcialment oxidats o parcialment reduïts mitjançant l'acceptació o donació d'electrons. Aquesta característica és favorable a l'hora de realitzar tècniques potenciomètriques.[7]

2.2.1. Poli(3,4-etilendioxitiofè)

El politiofè és únic entre tots els polímers conductors degut a la seva estabilitat ambiental. Com inconvenient, el monòmer presenta un alt potencial d'oxidació i els possibles enllaços α - β , β - β al produir-se la polimerització li confereixen unes propietats inferiors. Per superar

aquest punt negatiu es va sintetitzar el 3,4-etilendioxitiofè, el qual no presenta els enllaços α - β ni β - β que provocaven un descens en les propietats del politiofè. Per als poli(3-alquiltiofens), el grau de polimerització és de diversos centenars, en canvi per al politiofè el grau és d'entre 10 i 35 unitats, el creixement de la cadena monomèrica es produeix principalment en les posicions α 2 i 5 mostrades en la **Figura 5**.

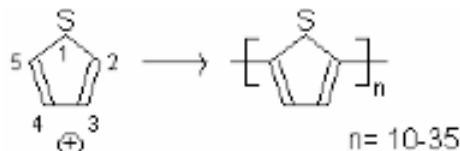


Figura 5. Esquema del procés de creixement de la cadena polimèrica del tiofè

Introduint una substitució en els poliheterocicles amb grups èter i polièter s'aconsegueixen propietats que en les molècules no substituïdes no es mostren tal com solubilitat o l'aparició de caràcter hidrofílic. Generalment els poliheterocicles substituïts no són gaire conductors (de 10^{-3} a 10^{-2} S/cm). La introducció del grup etilendioxi en les posicions 3 i 4 permet superar aquest inconvenient, com és el cas de l'EDOT. Aquest permet la producció del seu polímer PEDOT, veure **Figura 6**, sent molt estable i amb una gran conductivitat, de l'ordre d'entre 200 i 300 S/cm. El PEDOT és adequat per la implementació de dispositius electrònics tant per les bones propietats elèctriques i electroactives: baix potencial d'oxidació, alta conductivitat, una bona transparència òptica o una banda de gap moderada que presenta com per l'alta estabilitat ambiental al llarg del temps. Aquestes característiques són favorables per aplicacions de recobriments, com la que es realitzarà.

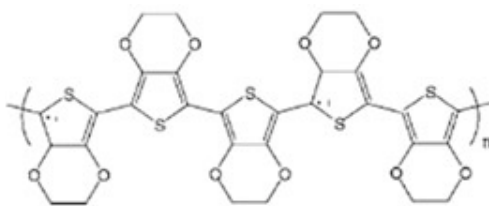


Figura 6. Esquema de la xarxa polimèrica de PEDOT

En estudis recents s'ha analitzat la capacitat del PEDOT com a sensor de diversos fàrmacs com la DA, l'àcid ascòrbic o l'àcid úric entre d'altres gràcies a les propietats descrites anteriorment i a la sensibilitat d'aquest polímer respecte a aquestes molècules: "recentment el PEDOT va ser utilitzat per la determinació selectiva de baixes concentracions de DA en presència d'àcid úric i àcid ascòrbic sent depositat sobre diferents tipus d'elèctrodes" [2], [14].

2.3. Hidrogels

Els hidrogels són materials molt similars als teixits biològics en termes de les seves propietats físiques degut al seu gran contingut en aigua i la seva consistència. A més, l'habilitat que presenten per a incorporar fàrmacs i la possibilitat de modificar-ne les propietats mitjançant estímuls externs els fan uns bons candidats per a ser utilitzats com a sistemes d'alliberament de fàrmacs per a diferents vies d'administració [15]. Els hidrogels són estructures basades en xarxes polimèriques tridimensionals hidròfiles que tenen la capacitat d'absorbir una gran quantitat d'aigua o de fluids biològics.

Els paràmetres més importants per a la caracterització de la xarxa polimèrica són:

- i) La quantitat màxima de fluid absorbit i retengut, anomenat també grau d'inflament Q .
- ii) El grau d'entrecreuament de l'hidrogel, determinat per la relació entre el número de mols d'entrecreuament i mols de polímer.
- iii) La grandària de malla de l'hidrogel, que proporciona la mesura de l'espai disponible entre les cadenes polimèriques.

El caràcter hidròfil dels hidrogels és degut a la presència de grups polars en la seva estructura: alcohols, àcids carboxílics, amides i àcids sulfònics. El grau d'inflament màxim que poden assolir depèn en major mesura del grau d'entrecreuament que presenti ja que a major grau d'entrecreuament més intensa és la cohesió entre les cadenes polimèriques i, per tant, menor la seva mobilitat i el seu inflament.

Els hidrogels sensibles al pH contenen grups àcids o alcalins capaços d'acceptar o alliberar un protó en resposta a canvis en el pH del medi. Els hidrogels amb un gran nombre de grups ionitzables reben el nom de polielectròlits. Per a hidrogels que tenen grups àcids, aquests es trobaran ionitzats amb càrrega negativa per a valors de pH superiors al pK_a de l'àcid, de manera que experimentaran un gran inflament degut a la repulsió de les cadenes polimèriques entre si. De forma contrària, els hidrogels que contenen grups bàsics experimentaran una contracció de volum a pHs alcalins.

Els hidrogels constituïts de polímers biocompatibles són una bona opció per a ser utilitzats com a sistemes d'alliberació de fàrmacs ja que les seves propietats físiques són similars a la dels teixits biològics. La capacitat que mostren per a encapsular i alliberar molècules de

diferent grandària gràcies a la seva capacitat d'inflament, els fan adequats de a diferents vies d'administració. La cinètica de l'alliberament dels hidrogels depèn de les propietats del fàrmac (pes molecular, solubilitat en el medi i afinitat amb l'hidrogel) i de les característiques pròpies de l'hidrogel tal com geometria, superfície específica o grau d'inflament.

Així, mitjançant el control de l'estructura de l'hidrogel és possible controlar l'alliberament de les molècules que es troben en el seu interior. [15]

2.3.1. Àcid γ -glutàmic

L'àcid poli γ -glutàmic (PGGA) es pot considerar una poliamida o el nylon-4 substituït per un grup carboxil en el carboni 4. L'excel·lent biodegradabilitat, biocompatibilitat i la no toxicitat que presenta el polímer juntament amb el fet d'estar funcionalitzat, el fan atractiu per aplicacions biomèdiques i farmacèutiques d'ús temporal.

El PGGA és una poliamida modificada amb la particularitat de ser biodegradable, tenir un centre asimètric i presentar una conformació fortament dependent del pH del medi, concentració iònica i de la concentració del polímer. Si es treballa a pH superior a 7, les cadenes es troben en una geometria més estesa mentre que a pH inferior a 3 (mantenint les mateixes concentracions del polímer) les cadenes es troben en estructures més globulars. El PGGA és un poliàcid de $pK_a = 2.27$, per tant és un polielectròlit que es pot trobar ionitzat quan es troba en forma de sal o sense ionitzar com a poliàcid. El PGGA es degrada ràpidament amb aigua a temperatures superiors a 60°C ; a temperatures inferiors la velocitat disminueix tot i seguir sent notable. Els hidrogels que presenten respostes davant d'estímul externs reben el nom d'hidrogels intel·ligents.

La major part de les aplicacions del PGGA se centren en l'indústria alimentària, desenvolupant material floculant i gelificant i el en sector mèdic amb investigacions sobre la utilització del polímer com a material biomèdic. El creixent interès del PGGA per aplicacions biomèdiques es deu a les propietats abans esmentades: solubilitat en aigua, biodegradabilitat i no toxicitat. Així, els hidrogels biocompatibles com el HPGGA presenten l'avantatge que no hauran de ser extrets de l'organisme per tècniques quirúrgiques [14].

CAPÍTOL 3. OBJECTIUS

3. Objectius

L'objectiu principal del present treball de fi de grau és la fabricació d'un dispositiu basat en poli(3,4-etilendioxitiòfè) (PEDOT) i hidrogel d'àcid γ -poliglutàmic (HPGGA), on aquest actua com a sistema d'alliberació i detecció simultània de dopamina (DA).

Per tal d'implementar un dispositiu que realitzi un alliberament òptim del fàrmac a la vegada que detecta les dosis lliurades al medi i per tant, assolir el principal objectiu amb èxit es proposen els següents objectius secundaris:

- Anàlisi dels diferents hidrogels basats en PGGGA.
- Anàlisi de la incorporació de determinades dosis de DA en la xarxa polimèrica de l'hidrogel.
- Anàlisi dels factors que influeixen en el procés d'alliberament de DA.
- Producció d'estructures d'hidrogels òptimes per la implementació final del dispositiu.
- Obtenció d'una superfície que actua com a sensor de DA a baixes concentracions emprant capes de PEDOT.

Amb aquest conjunt d'objectius s'aconseguirà una visió global del procés de producció del dispositiu així dels factors que s'han de tenir en compte.

CAPÍTOL 4. PART EXPERIMENTAL

4. Part experimental

4.1. Materials

A continuació es llisten els materials emprats durant els assajos:

- Àcid γ -poliglutàmic; PM=1.500.000-2.500.000 adquirit de Wako
- 1-[3-(Dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida metiliodada adquirit de Sigma-Aldrich
- Tietanolamina (cistamina) (puresa 95%) adquirida de Sigma-Aldrich
- KCl (puresa 99%) adquirit de Merck
- NaCl i Na_2HPO_4 (puresa 99%) ambdós adquirits de Panreac
- Solució tampó fosfatada (PBS) 0,1M amb pH 7,4 va ser preparada com una solució electrolítica com a mescla de quatre solucions en estoc de NaCl, KCl, NaHPO_4 i KH_2PO_4 ; el pH s'ajusta posteriorment amb NaOH.
- Solució tampó amb pH 6 va ser preparada com una solució electrolítica com a mescla de dues solucions d'àcid cítric (0,1M) i citrat de sodi (0,1M); el pH s'ajusta posteriorment amb HCl.
- Solució tampó fosfatada amb pH 4.5 va ser preparada com una solució electrolítica com a mescla de dues de Na_2HPO_4 (0,2M) i àcid cítric (0,1M); el pH s'ajusta posteriorment amb HCl.
- Solució tampó amb pH 2,2 va ser preparada com una solució electrolítica com a mescla de dues solucions de KCl i HCl (0,2M); el pH s'ajusta posteriorment amb HCl.
- Gelatina de pell porcina, força gelificant 300, tipus A de Sigma Aldrich

4.2. Equips

A continuació s'expliquen breument els equips emprats durant els assajos.

4.2.1. Espectròmetre d'Infraroig per Transformada de Fourier (TF-IR)

L'espectre TF-IR de les mostres va ser obtingut en un espectròmetre 4100 Jasco. Les mostres es van situar en un accessori de cristall de diamant ATR (Specac model MKII Golden Gate) que permet la reflexió total de la llum. L'espectre d'infraroig va ser mesurat en el rang $350\text{-}7800\text{ cm}^{-1}$, prenent 64 escanejos amb una resolució de 4 cm^{-1} en mode

transmitància.

4.2.2. Espectròmetre d'ultraviolat i visible (UV-Vis)

L'espectre UV-Vis de les mostres extretes durant diferents assajos va ser registrat utilitzant l'espectrofotòmetre *UV-Vis-NIR Shimadzu 3600*. L'equip conté una font halògena del visible de tungstè, una font UV de deuteri, un detector UV-Vis en forma de tub fotomultiplicador, un fotodíode de InGaAs i un detector de PbS NIR amb una fotocèl·lula refredada. El rang de longituds d'ona emprades va ser de 220 a 330 nm. Els espectres es van obtenir en el mode d'escaneig simple a una velocitat d'escaneig de 60 nm/min utilitzant el software *UVProbe 2.31* en el mode d'absorbància.

4.2.3. Microscopi digital

Les imatges macroscòpiques dels hidrogels durant tot l'estudi es van obtenir mitjançant el microscopi digital *Dino-Lite AM7013MZT*, el qual permet a l'usuari enfocar i augmentar la imatge de forma manual.

4.2.4. Microscopi electrònic de rastreig (MER)

Els estudis amb el MER es van dur a terme utilitzant un microscopi d'escaneig electrònic *Focused Ion Beam Zeiss Neon40*. El microscopi es troba equipat amb un sistema d'espectroscòpia de raigs X per dispersió d'energia (XDE) operant a 5 kV. Les mostres es van muntar en un disc de carboni de doble cara que permet l'adhesió sobre la seva superfície revestida, per bombardeig electrònic, amb una fina capa de carboni per prevenir problemes de càrregues en les mostres.

4.2.5. Potenciostat

Les deteccions electroquímiques es van realitzar per ciclovoltmetries utilitzant l'equip *Autolab PGSTAT302N*. Tots els experiments es van realitzar en una cel·la de vidre amb 7 ml de solució tampó fosfatada (PBS, pH 7.4) 0.1 M a temperatura ambient i sense agitació. Com a referència es va utilitzar un elèctrode Ag|AgCl i un de platí (Pt) com a contra. El potencial inicial i final van ser de 0.4 V i un potencial invers de 0.8 V. La velocitat d'escombrat va ser de 50 mV·s⁻¹.

La tècnica de ciclovoltimetria (CV) permet determinar les propietats electroquímiques del

PEDOT, com per exemple l'electroactivitat i l'estabilitat. Les ciclovoltaïmetries també mostren els potencials en els que es produeixen els processos d'oxidació i reducció de les mostres. La tècnica es basa en aplicar un escombrat de potencial a l'elèctrode de treball tant en sentit directe com invers des d'un valor inicial fins un valor de tall. No cal que aquests dos valor coincideixin, si més no en aquest estudi sempre han coincidit en valor. L'escombrat cíclic es pot repetir tantes vegades com siguin necessàries. La velocitat d'escombrat es pot determinar mitjançant el pendent de la variació del potencial.

Per un sistema reversible i considerant que l'escombrat s'inicia en sentit anòdic, s'observa que a l'assolir el valor de potencial adequat per a que comenci la reacció d'oxidació, la corrent augmenta notablement fins a un valor màxim. Donat que l'espècie que reacciona es consumeix en la superfície de l'elèctrode, el corrent d'oxidació descendeix a mesura que el potencial augmenta. Una vegada assolit el potencial de tall, l'escombrat de potencial s'inverteix i s'obté un augment del corrent catòdic corresponent al procés de reducció. El cicle finalitza quan s'assoleix de nou el potencial inicial, en els posteriors assajos. Per tant, els valors a tenir en compte són els de les corrents obtingudes en els màxims (pic d'oxidació) que en el cas de la DA es troba entre els 0.3 i 0.4 V.

Una altra tècnica que es va aplicar durant els assajos va ser la cronoamperometria (CA). Aquesta tècnica es basa en el canvi instantani del potencial de l'elèctrode de treball (WE) mentre es mesura el corrent en funció del temps com es mostra en la **Figura 7**.

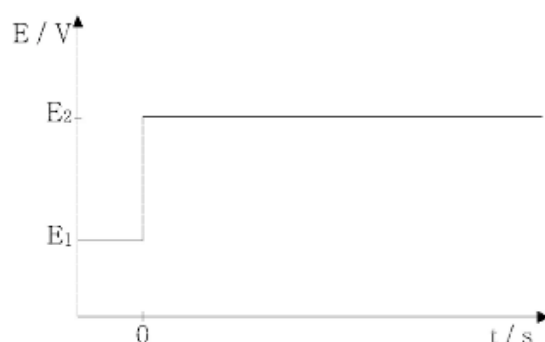


Figura 7. Representació del canvi instantani teòric del potencial de l'elèctrode en una CA

4.3. Mètodes

4.3.1. Hidrogels d'àcid γ -poliglutàmic (HPGGA) en pastilla

4.3.1.1. Preparació i caracterització de HPGGA

Per la preparació dels hidrogels basats en l'àcid γ -poliglutàmic (PGGA), es van utilitzar dos pesos moleculars ben diferenciats de PGGA: 200.000 i 1.500.000 g/mol. El diclorur de cistamina es va utilitzar com agent entrecreuant, el qual conté dos grups amina terminals que poden reaccionar amb els grups àcids del PGGA. El procés de reacció entre els grups amina i àcids es dur a terme mitjançant l'acció de la carbodiimida (Carb) soluble en aigua, 1-[(3-dimetilamina)propil] 3-etilcarbodiimida metiliodada, que actua com agent condensant. Per tal de variar el grau d'entrecreuament de l'hidrogel es van emprar diferents concentracions de l'agent entrecreuant.

La preparació dels hidrogels, excepte l'HPGGA-a2.5, va consistir en dissoldre 5 mmol de PGGA i 5mmol de 1-[(3-dimetilamina)propil] 3-etilcarbodiimida metiliodada en 10mL d'una solució de NaHCO_3 0.5M a una temperatura de 4°C per facilitar la dissolució. Posteriorment es va afegir el diclorur de cistamina (2.5mmol o 1.5mmol, per obtenir un entrecreuament alt o baix, respectivament) amb agitació magnètica (800 rpm) durant 1 minut. Seguidament, es van introduir alíquotes d'1mL de la mescla en pouets de placa petri (diàmetre de 1.46 cm) i es va mantenir a 25°C durant 24 hores. Finalment, es van extreure els hidrogels dels pouets i es van rentar amb aigua MiliQ durant aproximadament 3 hores per tal d'assegurar l'eliminació de la diürea generada. Un cop finalitzat el procés de rentat van ser liofilitzats durant 48 hores i emmagatzemats en un dessecador fins la seva utilització.

Per la síntesis de HPGGA-a2.5, el procediment va ser similar a l'esmentat anteriorment. La diferencia recau únicament en l'addició del diclorur de cistamina, el qual va ser diluït en NaHCO_3 0.5M i afegit una vegada la mescla de PGGA i carbodiimida era introduïda en la placa petri. Un cop addicionada la cistamina, es va mantenir la placa de petri en agitació suau durant 1 min per tal de facilitar la difusió de la mateixa cap a l'interior de la matriu.

D'altra banda, en aquests estudis preliminars es van analitzar HPGGA sintetitzats anteriorment pel grup d'investigació de *Polímers Sintètics: Estructura y Propietats. Polímers biodegradables* - PSEP (estudi no publicat). Les principal diferències entre aquests i els hidrogels sintetitzats en aquest treball és l'agent condensant, on en aquest cas va ser la 1-

[(3-dimetilamina)propil] 3-etil carbodiimida, i la geometria dels hidrogels no seguia cap patró obtenint-se diferents mostres amorfes.

En la **Taula 1** s'indiquen els diferents HPGGA sintetitzats i/o utilitzats així com les quantitats d'agent entrecreuant, condensant i pes molecular dels PGGA emprats. La codificació dels hidrogels s'expressa com HPGGA-X.XX, on el primer dígit fa referència al pes molecular del PGGA, sent "a" pel pes molecular alt i "b" pel pes molecular baix i els dos últims dígits fan referència a la quantitat de diclorur de cistamina utilitzada.

Hidrogel	Polímer:Entrecruant (mmol:mmol)	Carbodiimida (mmol)
HPGGA-b1.5	5:1.5	5
HPGGA-b2.5	5:2.5	5
HPGGA-a2.5	5:2.5	5
HPGGA-a1.5*	5:1.5	5
HPGGA-a2.5*	5:2.5	5
HPGGA-b1.5*	5:1.5	5
HPGGA-b2.5*	5:2.5	5

Taula 1. HPGGAs sintetitzats

Nota 1: Hidrogel obtingut utilitzant com agent condensant 1-[(3-dimetilamina)propil] 3-etil carbodiimida indicat amb asterisc *.

4.3.1.1.1 Anàlisi dels HPGGA mitjançant Espectroscopia Infraroja amb Transformada de Fourier (TF-IR)

El PGGA-a i PGGA-b van ser analitzats mitjançant FT-IR per tal d'identificar el canvis produïts en la estructura química dels diferents HPGGA sintetitzats, prenent especial atenció en el rang espectral comprès entre 1730 i 1500 cm⁻¹. En aquesta zona s'observen les bandes assignades als enllaços amida formats per l'entrecreuament entre els grups amina del diclorur de cistamina i els grups d'àcid carboxílic del PGGA.

4.3.1.2. Determinació del grau d'inflament en funció del grau d'entrecreuament, pes molecular del PGGA i tipus de carbodiimida.

Es va estudiar el grau d'inflament (Q) en funció de tres factors: grau d'entrecreuament (alt-2.5 o baix-1.5), pes molecular del polímer PGGA (alt-a o baix-b) i del tipus de carbodiimida (1-[(3-dimetilamina)propil] 3-etilcarbodiimida metilodada o 1-[(3-dimetilamina)propil] 3-etilcarbodiimida-*). Es van seleccionar mostres dels següents HPGGA: HPGGA-b1.5, HPGGA-b2.5, HPGGA-a2.5, HPGGA-b1.5*, HPGGA-b2.5*, HPGGA-a2.5* i HPGGA-a1.5*. L'ús de HPGGA-XXX* es va realitzar únicament per obtenir una comparativa més àmplia entre diferents hidrogels. Cada mostra es va pesar abans de submergir-la en aigua quedant totalment coberta. Seguidament es van realitzar pesades a cada interval de temps estipulat fins que la mesura es va estabilitzar, havent arribat al seu màxim grau d'inflament. Quan es feia una pesada es retirava l'excés d'aigua de la superfície de l'HPGGA ja que no es contempla com a volum absorbit. L'assaig es va realitzar per triplicat. Per a determinar la relació d'inflament dels hidrogels, es van pesar els hidrogels inflats i s'ha calculat mitjançant l'expressió següent:

$$Q(\%) = \frac{W_h - W_s}{W_s} \times 100$$

Equació 1. Expressió per determinar el grau d'inflament (Q)

on W_s (mg) és el pes de l'hidrogel liofilitzat i W_h (mg) el pes de l'hidrogel humit.

4.3.1.2.1 Determinació del grau d'inflament en funció del pH del medi

Després de l'obtenció d'hidrogels mitjançant entrecreuament químic, aquests es van submergir en diferents solucions tampó, indicades en la Taula 2, durant 24 hores a temperatura ambient, període necessari per assolir l'equilibri d'inflament. L'assaig es va realitzar amb HPGGA-b1.5 i HPGGA-b2.5 a 25°C i sense agitació.

Solució tampó	Composició	HPGGA avaluats
Àcid cítric / fosfat pH=4.5	0.1 M àcid cítric 0.2 M fosfat de sodi	HPGGA-b1.5 HPGGA-b2.5
Fosfats (0.1M PBS) pH=7.3	1.37 M NaCl 0.027 M KCl 0.1 M Na ₂ HPO ₄ 0.018 M KH ₂ PO ₄	

Taula 2. Solucions tampó emprades com a medi per determinar el grau d'inflament

Es va realitzar un altre estudi amb l'objectiu de determinar en més detall el grau d'inflament que experimenten determinats HPGGA segons el medi en que s'hidraten. Es van realitzar canvis cíclics en el pH del medi de pH 4.5 i 7.3 degut a que els hidrogels de PGGA són sensibles al pH. L'assaig es va realitzar amb HPGGA-b2.5 a 25°C i sense agitació. En medi àcid les mostres es van submergir durant 24 hores abans de realitzar la pesada; en dissolució neutre es realitza un control del pes en intervals de 30 minuts durant 1 hora i mitja ja que la inflada es produeix més ràpidament en aquest medi.

Totes les mesures de pH es van determinar mitjançant un pH-metre.

4.3.1.3. Incorporació i alliberació de dopamina

4.3.1.3.1 Incorporació de DA

La incorporació de DA en la matriu polimèrica es va dur a terme mitjançant la immersió dels hidrogels liofilitzats en un solució tampó de citrat (pH=4.5) amb 6mg/ml de DA durant 24 hores a 10°C. Posteriorment, els hidrogels amb la DA ja incorporada en la matriu eren liofilitzats durant 48 hores i emmagatzemats a 10°C per a la seva adequada conservació.

Es va realitzar un assaig previ al procediment anteriorment esmentat amb l'objectiu de determinar el pH òptim per la incorporació de DA dins de l'estructura de l'hidrogel. A continuació es descriu el procediment:

- *Influència de la solució tampó per a la incorporació de DA:* L'assaig es va realitzar amb HPGGA-b1.5/2.5 i HPGGA-b1.5*/2.5*. Per aquest assaig es va emprar dues concentracions de DA, 3 i 6 mg/ml. Les mostres d'un mateix grup d'hidrogels es van submergir en dues solucions tampó diferents: una de pH 2,2 i un altre de pH 4,5 (amb la DA prèviament incorporada segons la concentració desitjada), segons la Taula 3 a una temperatura de 10°C i sense agitació durant 4 hores.

Solució tampó	Composició
Àcid clorhídric/ Clorurs pH=2.2	0.2 M Àcid clorhídric 0.07M Clorur de potassi
Àcid cítric/Fosfat pH=4.5	0.1 M Àcid cítric 0.2 M Fosfat de sodi

Taula 3. Solucions tampó emprades com a tampó per la incorporació de DA

4.3.1.3.1.1 Determinació de la presència de DA mitjançant Espectroscòpia Infraroja per Transformada de Fourier (TF-IR)

Els diferents HPGGA amb DA incorporada van ser analitzats mitjançant TF-IR per tal confirmar la presència de DA en la matriu i identificar els canvis produïts en el rang espectral comprès entre 1730 i 1500 cm⁻¹.

4.3.1.3.1.2 Determinació de la concentració de DA incorporada en HPGGA

Per tal de determinar la concentració de DA incorporada com alliberada des de l'HPGGA, es va construir una recta de calibratge a partir d'una mostra patró emprant un rang de concentracions entre 0.05 mM fins a 0.39 mM de DA en solució tampó de citrat (pH=4.5) mitjançant UV-vis a una longitud d'ona de 280nm. La determinació es va realitzar per triplicat. La recta que es va obtenir és la que es mostra en la **Figura 8**.

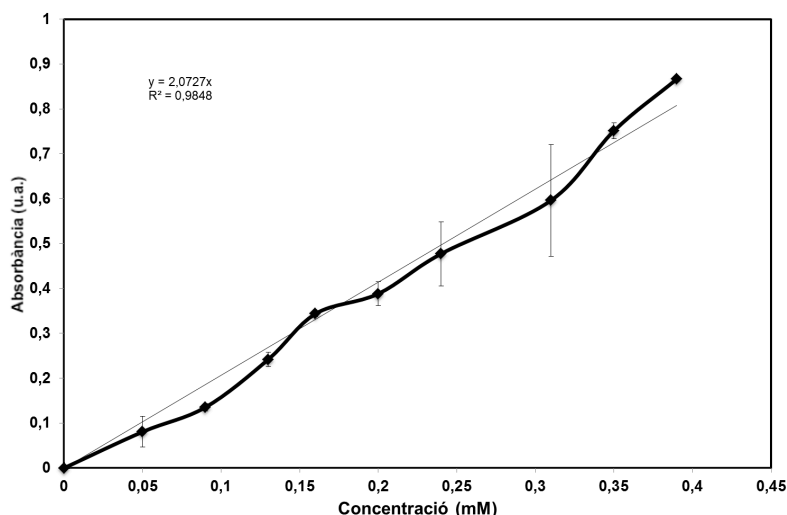


Figura 8. Recta de calibratge de DA en solució tampó d'àcid cítric (pH 4.5) mitjançant UV-Vis

Una vegada construïda la recta de calibratge es va poder determinar la concentració de DA que s'havia incorporat en l'estructura dels HPGGA respecte a la concentració de la solució àcida (pH 4.5) amb DA dissolta. Les mostres estudiades van ser: HPGGA-b1.5, HPGGA-b2.5 i HPGGA-a2.5. Aquest medi contenia una càrrega de DA de 6mg/ml. Es va submergir una mostra de HPGGA-b1.5 en el medi amb DA i es va deixar 24 hores a 10°C. Passat aquest temps la mostra ja havia arribat al seu màxim grau d'inflament. Es va analitzar una alíquota del sobrenedant restant per tal de determinar la concentració de DA mitjançant UV-Vis. L'equació emprada per tal de determinar l'eficiència de l'absorció del fàrmac dins de l'hidrogel va ser la següent, **Equació 2**:

$$\text{Eficiència d'absorció (\%)} = ((C_i - C_f) / C_i) \times 100$$

Equació 2. Expressió per la determinació de l'eficiència d'absorció del fàrmac

On C_i és la concentració inicial de fàrmac en el medi solució i C_f és la concentració de DA en el medi una vegada s'ha produït l'absorció.

4.3.1.3.2 Alliberació de DA

Per dur a terme les alliberacions, es van submergir els diferents HPGGA liofilitzats amb DA incorporada en 3mL solució tampó d'àcid cítric (pH=4.5) a 37°C amb agitació (90rpm) per tal de poder simular de la forma més aproximada les condicions del torrent sanguini en l'humà. Tot i que el pH empleat no s'aproxima a les condicions reals de la sang, permet realitzar l'alliberació de DA durant un espai de temps suficientment elevat per obtenir dades completes sense que la DA pateixi una oxidació prematura degut al pH.

Per determinar concentració de DA alliberada pels hidrogels es van extreure alíquotes de 1ml a cada període de temps estipulat durant 24 hores. Posteriorment s'analitzava mitjançant UV-Vis en un rang de longitud d'ona entre 220 i 330 prestant atenció als 280nm, longitud on la DA mostra el seu pic. A cada extracció es feia una reposició de la solució tampó per tal de mantenir el volum constant.

- *Influència del pH en l'alliberació de DA:* Es va determinar quin era el pH més proper a pH neutre en el que es produïa una correcta alliberació de DA sense que aquesta s'oxidés prematurament. Es desitjava avaluar les alliberacions a un pH el més proper a pH neutre per simular de la forma més aproximada les condicions de la sang. Es van seleccionar dues mostres de HPGGA-b1.5_DA i altres dues de HPGGA-b2.5_DA. Una de cada tipus es va submergir en 10 ml d'un medi a pH 6 o 7 durant 24 hores a 10°C. S'eliminava el factor temperatura restant únicament el factor del pH del medi com a accelerador de l'oxidació de la DA.

4.3.2. Elèctrode de carboni modificat amb PEDOT- HPGGA com sistema d'alliberació i detecció simultània

4.3.2.1. Preparació i caracterització de l'elèctrode serigrafiat de carboni (ESC) modificat amb PEDOT i HPGGA

Les principals etapes associades al procés de fabricació i caracterització del dispositiu s'esquematitzen breument en la **Figura 9**. Es poden dividir en tres processos diferenciats:

1. Preparació de l'elèctrode serigrafiat de carboni modificat amb poli (3,4-etilendioxitiofè) i hidrogel d'àcid γ -poliglutàmic (ESC-PEDOT/HPGGA).
2. Incorporació de DA en la matriu.
3. Alliberació i detecció simultània de DA en un medi regulador de fosfats (PBS, pH=7.3).

En els apartats posteriors es descriu de manera més detallada les diferents etapes del procés.

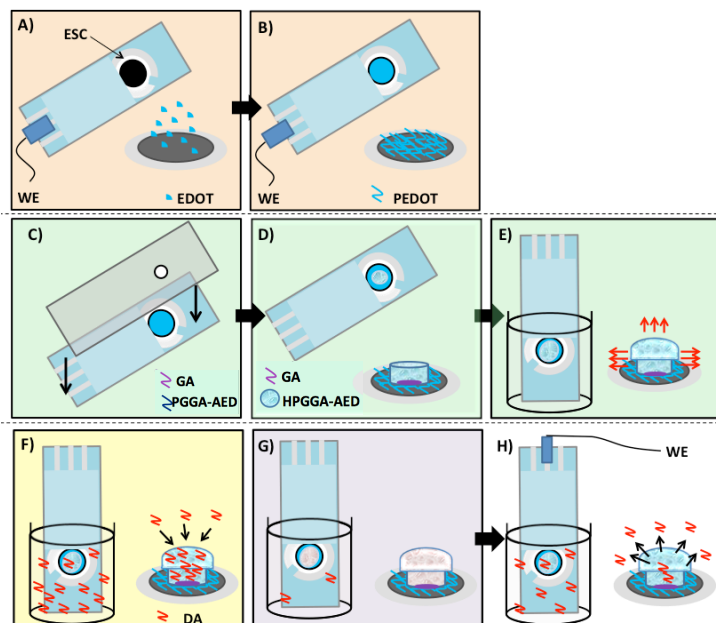


Figura 9. Etapes de preparació de l'elèctrode de carboni modificat amb PEDOT /GA/HPGGA-b2.5. a) i b) Polimerització electroquímica de 3,4-etilendioxitiòfè (EDOT) sobre l'elèctrode serigrafiat de carboni (ESC), c) Aïllament plàstic (p.e. Tefló) de la zona de no treball, d) Incorporació de gelatina en la zona de treball, i seguidament PGGA-AED, e) Rentat del HPGGA, i posterior immersió en medi àcid, f) Incorporació de DA, g) Rentat de ESC-PEDOT/GA/HPGGA en medi neutre i h) Alliberació i detecció electroquímica simultània de DA.

4.3.2.1.1 Elèctrode serigrafiat de carboni (ESC)

Per la preparació de PEDOT/HPGGA com sistema d'alliberació i detecció simultània de DA, s'han utilitzat els elèctrodes serigrafiats de carboni (ESC) d'un sol ús del tipus DS-150 (Dropsens). La principal característica que presenta aquest tipus d'elèctrode és la conjunció de tres elèctrodes en un mateix sistema (elèctrode de treball, de referència i auxiliar), tal i com s'indica en la **Figura 10**, i on cada un d'ells està format per diferents materials amb dimensions i disposicions diferents sobre el substrat ceràmic com es mostra a continuació. Els materials presents en l'elèctrode són: platí en l'elèctrode auxiliar (CE), plata en l'elèctrode de referència (RE) i carboni en l'elèctrode de treball (WE). El diàmetre de l'elèctrode de carboni és 4 mm.

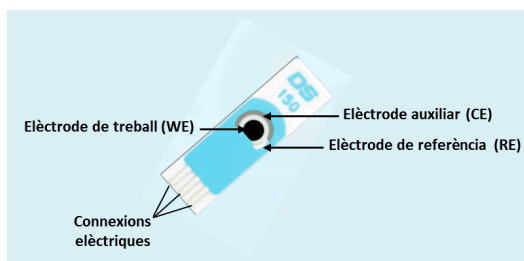


Figura 10. Elèctrode del tipus DS-150

4.3.2.1.2 Preparació del film de PEDOT en ESC

En aquest treball, l'elèctrode de treball i l'auxiliar s'han recobert amb PEDOT amb la finalitat de ser utilitzats en les alliberacions com a elèctrodes de treball. Concretament, l'elèctrode de treball de carboni s'ha utilitzat per la posterior incorporació de HPGGA mentre que, l'elèctrode auxiliar s'ha emprat únicament per determinar les concentracions de DA durant les alliberacions. L'elèctrode auxiliar va ser produït per realitzar un control extra de la detecció de DA durant el procés d'alliberació.

Els recobriments de PEDOT es van generar per via electroquímica mitjançant la tècnica de cronoamperometria (CA), tal i com s'indica en la **Figura 11a) i b)**. Aquest procés consisteix en la utilització d'una cel·la electrolítica constituïda per tres elèctrodes: acer inoxidable de AISI306 de $1.2 \times 13 \text{ cm}^2$ empleat com a CE, un elèctrode de Ag/AgCl (0.1 M KCl) com RE i l'elèctrode DS-150 com WE. 20 mM del monòmer 3,4-etilendioxitiòfè (EDOT) es van dissoldre en un volum de 10ml d'acetonitril amb 0.1M de LiClO_4 , on aquest últim actua com a electròlit. El potencial aplicat per l'electropolimerització d'EDOT és 1.4V, corresponent al potencial d'oxidació del monòmer EDOT. El temps de polimerització aplicat en l'elèctrode de carboni és de 60 segons. Després de l'electropolimerització, es va procedir al rentat de l'elèctrode DS-150 amb acetonitril per tal d'eliminar l'excés de l'electròlit i monòmer no reaccionat. Finalment, es va deixar assecar a temperatura ambient durant 24 hores.

4.3.2.1.3 Preparació del HPGGA en ESC-PEDOT

Degut a la necessitat d'una geometria i mides específiques de l'hidrogel sobre l'ESC, es va fer ús d'un motlle de tefló amb un orifici que permetia mantenir aïllada la superfície de no treball.

Un motlle de tefló va ser col·locat a la superfície de ESC-PEDOT, tal i com s'indica en la **Figura 11c)**. El motlle format per un film de tefló amb un gruix de 2 mm, presenta un orifici de diàmetre 2mm deixant únicament exposada una part central del ESC-PEDOT. L'orifici present en el tefló fa la funció de motlle per obtenir la geometria desitjada de l'HPGGA una

vegada dipositat, **Figura 11d**). Prèviament a incorporar l'hidrogel en l'orifici, es va addicionar 1 μ L de gelatina al 10% (p/v) sobre el film de PEDOT per tal d'assegurar l'adhesió entre l'HPGGA i el film de PEDOT.

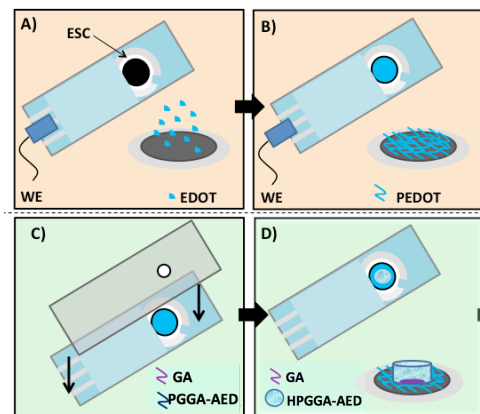


Figura 11. Etapes de preparació de l'HPGGA-b2.5 en ESC-PEDOT a) i b) Polimerització electroquímica de 3,4-etilendioxitiòfè (EDOT) sobre l'elèctrode serigrafiat de carboni (ESC), c) Aïllament plàstic (p.e. Tefló) de la zona de no treball, d) Incorporació de gelatina en la zona de treball, i seguidament PGGA-AED

4.3.2.2. Incorporació i alliberació de DA

Per a la incorporació de DA en el HPGGA-b2.5, es va submergir la secció del dispositiu amb l'hidrogel en una solució tampó d'àcid cítric (pH 4.5) amb una concentració de 6mg/ml de DA durant 24 hores a 10°C sense agitació. La incorporació va tenir lloc degut a la difusió per aconseguir l'equilibri de concentracions segons la llei de Fick.

4.3.2.2.1 Determinació de la concentració de DA incorporada en HPGGA

Previ a realitzar els assajos d'alliberació es va construir la recta de calibratge emprant un dispositiu amb el conjunt GA-HPGGA-b2.5 dipositat sobre el film PEDOT sense contingut de DA, el qual es renta en solució tampó PBS (pH 7.3) ja que, els hidrogels s'han conservat en solució àcida. S'incorporen 6 ml de PBS a la cel·la i es pinça el dispositiu que actuarà com a sensor, l'elèctrode de referència i el contra. Per a que el film de PEDOT s'estabilitzi electroquímicament es realitzen 5 cicles a una velocitat de rastreig de 50 mV/s abans de començar el procés de detecció de DA. Posteriorment es van afegint quantitats controlades de DA. Per cada addició es va realitzar una CV, prestant atenció al rang entre 0.3 i 0.4 V on es mostra el pic pertanyent al senyal de la DA i s'extreia una alíquota de 0.8 ml per analitzar-la en l'UV-Vis, la qual es retornava posteriorment a la cel·la. Les rectes de calibratge que es

van obtenir es mostren en les figures **Figura 12** i **Figura 13**.

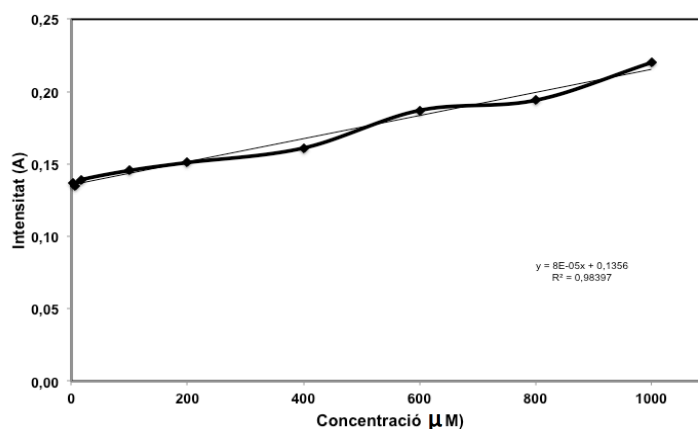


Figura 12. Recta de calibratge de DA en solució tampó PBS (pH 7.3) mitjançant UV-Vis

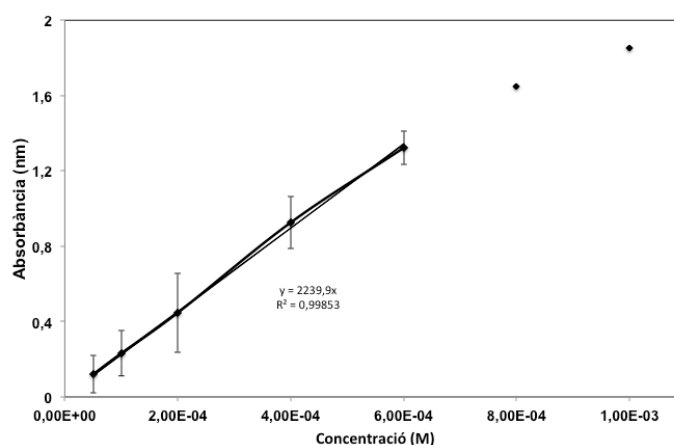


Figura 13. Recta de calibratge de DA en solució tampó PBS (pH 7.3) mitjançant potenciostat

4.3.2.2.2 Alliberació de DA

Els estudis d'alliberament es van dur a terme en una cel·la electrolítica que contenia 7 ml de solució tampó PBS (pH 7.3) a temperatura ambient i sense agitació. Les alliberacions han tingut una durada de 90 minuts, on les primeres determinacions es van realitzar en intervals de 10 minuts fins a completar la primera hora i en intervals de 15 minuts fins la finalització de l'assaig. Posteriorment a cada determinació el medi era homogeneïtzat. El seguiment s'ha realitzat simultàniament mitjançant CVs i UV-vis. Durant les alliberacions es va incorporar un sensor de control, sense DA, en el sistema de detecció.

Es van emprar els següents elèctrodes: de Ag/ClAg com a RE, de Pt com a CE i el propi dispositiu com a WE. Degut a que l'elèctrode ha estat 24 hores en solució àcida, per una millor conservació de la DA, es realitza un rentat amb PBS submergeint el dispositiu, d'aquesta forma s'aconsegueix retirar la DA superficial en excés. El procediment queda esquematitzat en la **Figura 14**.

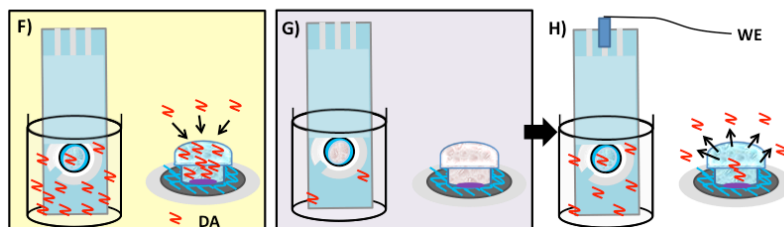


Figura 14. Esquema del procés de neteja, alliberació i detecció de DA des de l'elèctrode modificat

CAPÍTOL 5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

5. Resultats i discussió

5.1. Hidrogels d'àcid γ -poliglutàmic

5.1.1. Influència de la concentració de cistamina, carbodiimida i pes molecular de l'àcid γ -poliglutàmic en el procés d'entrecreuament

En el procés de producció dels hidrogels estudiats es van introduir variacions en el pes molecular del polímer emprat, l'àcid γ -poliglutàmic (PGGA), i en la concentració de AED (agent entrecreuant). Mitjançant aquests canvis, es va aconseguir obtenir hidrogels de pes molecular alt i baix (1.500.000 i 250.000 mg/mol, respectivament). Amb les variacions en la concentració de AED es van obtenir hidrogels amb dos graus d'entrecreuament, alt i baix (2.5 i 1.5, respectivament). També s'analitzen altres hidrogels sintetitzats amb la carbodiimida 1-[(3-dimetilamina)propil] 3-etilcarbodiimida provinents d'altres estudis, els qual es senyalen amb un asterisc final.

Mitjançant l'espectròmetre d'infraroig per transformada de Fourier (TF-IR), es va determinar qualitativament el grau d'entrecreuament dels HPGGA sintetitzats. Posteriorment, es va verificar la presència de DA en els hidrogels un cop finalitzat el procediment d'incorporació de la mateixa.

Els hidrogels caracteritzats sense DA van ser HPGGA-b1.5/2.5, HPGGA-a1.5*/2.5. Tots els espectres es mostren en les següents figures.

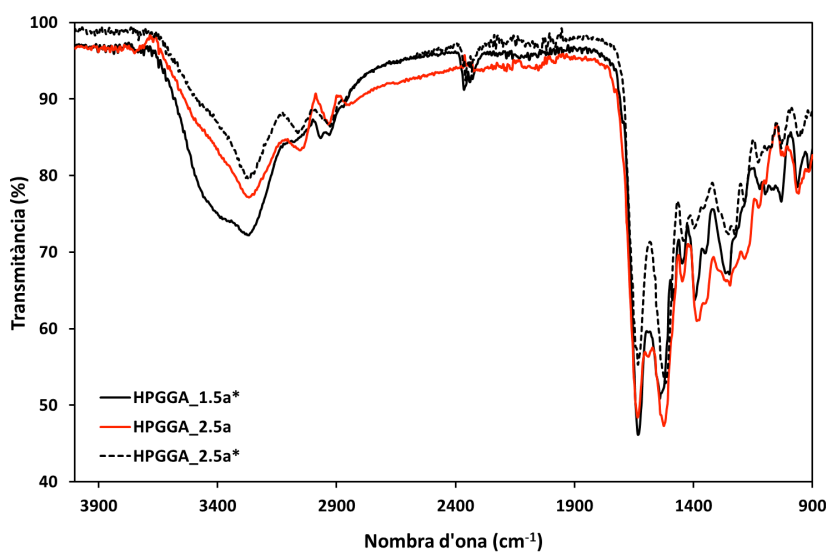


Figura 15. Espectre TF-IR de HPGGA-a1.5*/2.5/2.5*

En la **Figura 15** s'observa que l'única diferència que presenten els HPGGA de pes molecular alt, independentment de la carbodiimida utilitzada i del grau d'entrecreuament, és la intensitat dels pics. Tots tres espectres presenten pics a $1631\text{-}1634\text{ cm}^{-1}$ pertanyent a la freqüència de l'àcid carboxílic ionitzat, a 1588 cm^{-1} pertanyent a l'amida primària i a $1518\text{-}1545\text{ cm}^{-1}$ pertanyent a l'amida secundària.

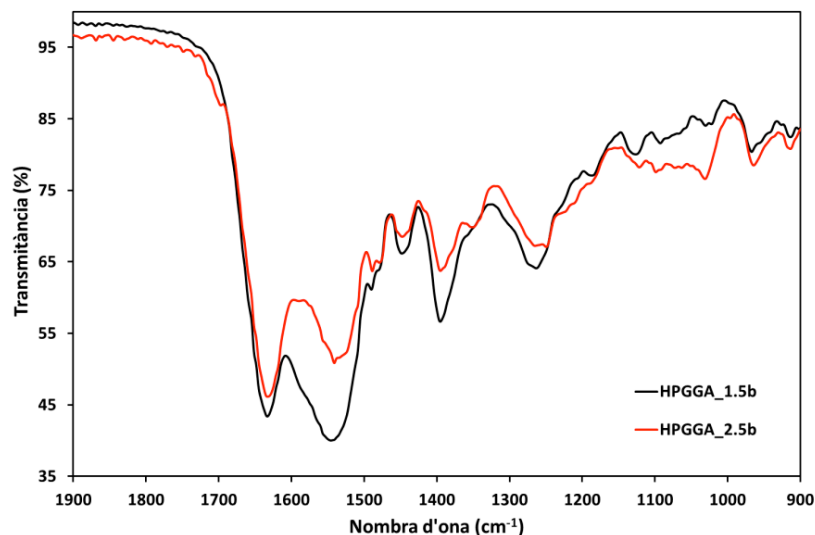


Figura 16. Espectre TF-IR de HPGGA-b1.5/2.5

En la **Figura 16** s'observa que l'única diferència que presenten els HPGGA de pes molecular baix, independentment del grau d'entrecreuament, és la intensitat dels pics. Tots dos espectres presenten pics a $1631\text{-}1633\text{ cm}^{-1}$ pertanyent a la freqüència de l'àcid carboxílic ionitzat, a $1584\text{-}1584\text{ cm}^{-1}$ pertanyent a l'amida primària i a $1538\text{-}1541\text{ cm}^{-1}$ pertanyent a l'amida secundària.

En la **Figura 17** es comparen els dos polímers que s'han emprat per la síntesi dels hidrogels: el de pes molecular alt (a) i baix (b). Només s'observen diferències en la intensitat del senyal: tots dos espectres presenten els senyals de l'àcid carboxílic (1725 cm^{-1}), de l'amida primària (1590 cm^{-1}) i el de l'amida secundària (1540 cm^{-1}).

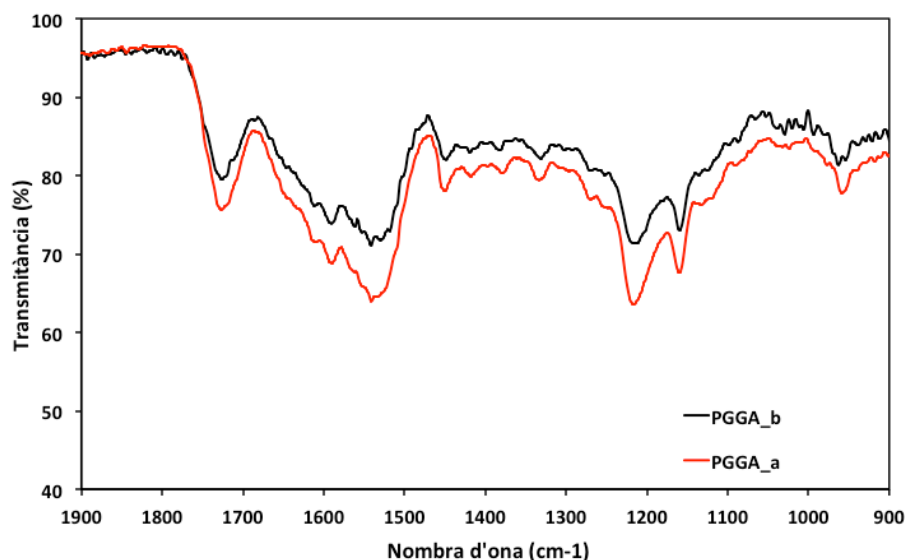


Figura 17. Espectre TF-IR de PGGA_b/a

Totes les freqüències dels diferents grups queden resumides en la **Taula 4**.

	Àcid carboxílic (v. tensió; -COOH)	Àcid carboxílic ionitzat (v. tensió; -COO ⁻)	Àmida I (v. tensió; -NH-CO-)	Àmida II (v. deformació; -NH-CO-)
PGGA_a	1726	-	1590	1540
PGGA_b	1725	-	1590	1540
HPGGA_1.5b	-	1633	1585	1541
HPGGA_2.5b	-	1631	1584	1538
HPGGA_1.5a*	-	1631	1588	1545
HPGGA_2.5a	-	1634	1588	1528
HPGGA_2.5a*	-	1633	1588	1518

Taula 4. Freqüències dels diferents grups funcionals en els espectres de HPGGA sense DA

Els hidrogels que contenen DA van ser: HPGGA-b1.5/2.5_DA i HPGGA-a1.5*/2.5_DA. Els espectres de HPGGA-a1.5*/2.5_DA no es mostren per l'elevada similitud amb els hidrogels de baix pes molecular. També es va obtenir l'espectre dels polímers d'alt i baix pes molecular així com els de la DA, **Figura 18**, els quals es mostren els dos següents espectres.

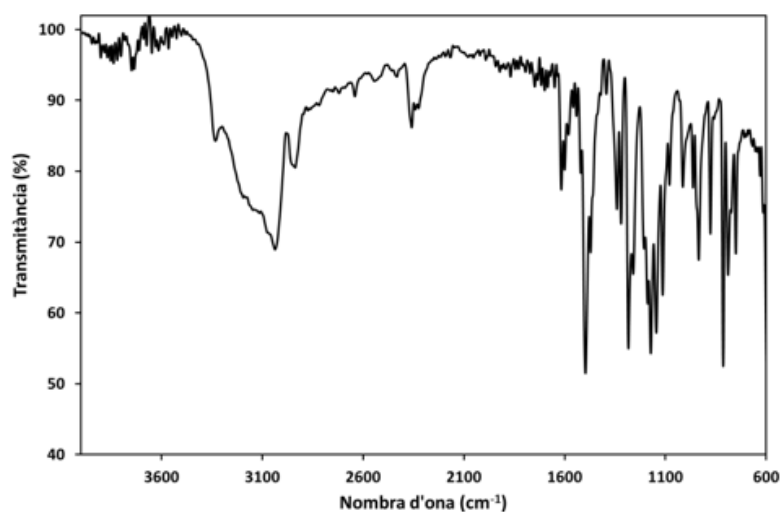


Figura 18. Espectre TF-IR de la DA

En la **Figura 19** es mostren els espectres de HPGGA-2.5/1.5b_DA juntament amb els dels mateixos tipus d'hidrogels sense la DA incorporada. S'observen bandes a 3331, 3194 i 3030 cm^{-1} que pertanyen als grups $-\text{OH}$, $-\text{CN}$ i $-\text{NH}$, respectivament. Entre 2431 i 2715 cm^{-1} apareixen les bandes dels grups aromàtics i alifàtics CH. El grup de flexió de CH presenta la banda a 1496 cm^{-1} . Finalment la tensió del grup fenòlic i el grup $-\text{OH}$ mostren bandes a 1283 i 1320 cm^{-1} , respectivament.

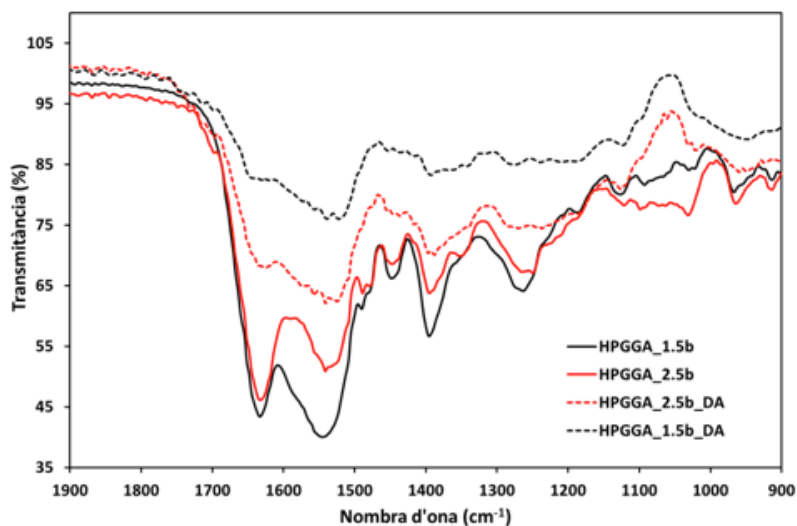


Figura 19. Espectre TF-IR de HPGGA-1.5/2.5b i HPGGA-1.5/2.5b_DA

En la **Taula 5** queden resumides les posicions de les bandes dels grups funcionals que s'han comentat anteriorment.

	Posició de la banda (cm^{-1})
V. Tensió de OH, CN i NH	3331, 3194 i 3030
V. Tensió de Aromàtic i alifàtic CH	2431-2715
V. Flexió de CH	1496
V. Tensió del grup fenòlic	1283
OH	1320

Taula 5. Freqüències dels diferents grups funcionals en els espectres de HPGGA amb DA

5.1.2. Inflament dels hidrogels en funció del pH del medi i concentració iònica del medi

La capacitat d'inflament dels HG depèn dels grups àcids o bàsics presents en la seva estructura, com els grups $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ ó $-\text{CONH}_2$, entre d'altres. Els factors determinants del grau d'inflament són, entre molts, la hidrofília de les cadenes polimèriques i, com s'ha vist anteriorment, la densitat dels entrecreuaments [12].

Els hidrogels formats per polímers iònics mostren un canvi dràstic en el seu grau d'inflament en funció del pH del medi. L'PGGA és un polielectròlit degut a la presència del grup carboxílic que conté (pK_a al voltant de 2.27). Així que, en medi aquós a un pH superior a 2.9, un hidrogel d'PGGA tindrà càrregues negatives en la seva matriu polimèrica a causa de la ionització del grup carboxílic. D'aquesta manera es generaran forces repulsives entre les cadenes polimèriques, provocant una expansió de l'estructura i un augment en l'absorció d'aigua. El canvi en el volum que es va experimentar també és degut al fet que en pH àcid la concentració de ponts d'hidrogen és major que a pH neutre. Els enllaços amida no es veuen afectats pel pH del medi. Per tant, és evident que a pH's àcids el volum es veurà reduït respecte a medis neutres degut a la reducció de les forces que mantenen cohesionat el material tal i com s'esquematitza en la **Figura 20**.

El paràmetre més indicatiu del canvi en la reticulació és el grau d'inflament Q que es determina a partir de **Equació 1** (apartat 4.3.1.2).

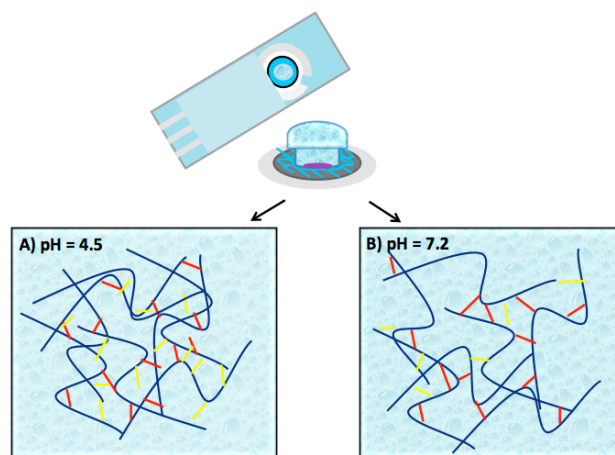


Figura 20. Efecte del pH del medi en l'inflament del HPGGA

Nota 1. En color groc s'indiquen els ponts d'hidrogen i en vermell els enllaços amida

És convenient analitzar l'evolució de l'inflament al llarg del temps. Es determinarà quin és el temps mínim necessari per a que els HGs estiguin totalment inflats i per tant, amb una estructura capaç d'incorporar la màxima quantitat de fàrmac possible. Aquest temps ve donat segons la pressió osmòtica que s'exerceixi sobre els diferents HGs, els quals presenten graus de reticulació diferents i de la concentració iònica del medi en el es trobin immersos.

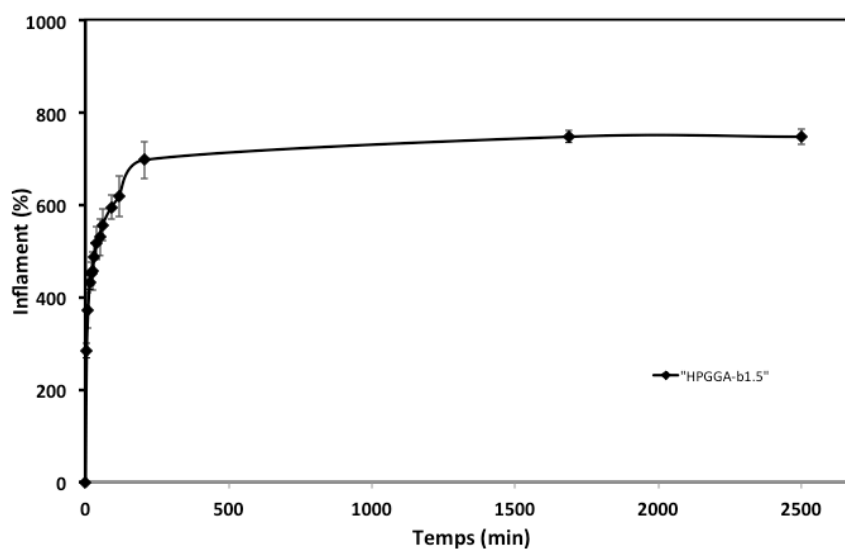


Figura 21. Perfil de inflament de HPGGA-b1.5 en pH 4.5

Els hidrogels amb un baix grau d'entrecreuament HPGGA-b1.5, com els de la **Figura 21**, requereixen d'unes 8 hores aproximadament per adquirir el màxim inflament de 750% en

medi àcid a pH 4.5 (solució d'àcid cítric). En canvi, els hidrogels amb un alt entrecreuament HPGGA-b2.5 necessiten un temps menor, uns 20 minuts aproximadament, per assolir l'estat d'inflament màxim del 350%, tal i com s'observa en la **Figura 22**.

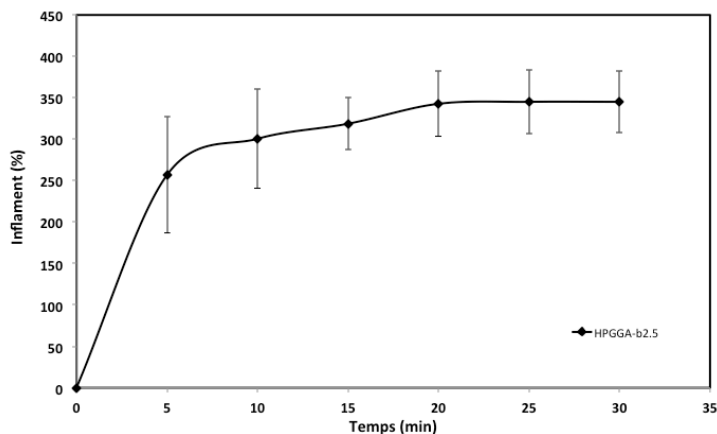


Figura 22. Perfil d'inflament de HPGGA-b2.5 en pH 4.5

Com a punt de referència es va realitzar un estudi del grau d'inflament dels HG en aigua destil·lada. En la **Taula 6** es resumeixen els resultats obtinguts:

Hidrogel	Q (%)	σ
HPGGA-b1.5	987	114,1
HPGGA-b2.5	689	15,2
HPGGA-a2.5	517	60,3
HPGGA-b1.5*	833	55,4
HPGGA-b2.5*	572	40,7
HPGGA-a2.5*	94	6
HPGGA-a1.5*	1913	169

Taula 6. Grau d'inflament Q dels HPGGA en aigua destil·lada.

Un altre assaig per determinar l'efecte del pH en Q es va realitzar fent canvis cíclics en el pH de HPGGA-b2.5. Obtenint-se el perfil de la **Figura 23**.

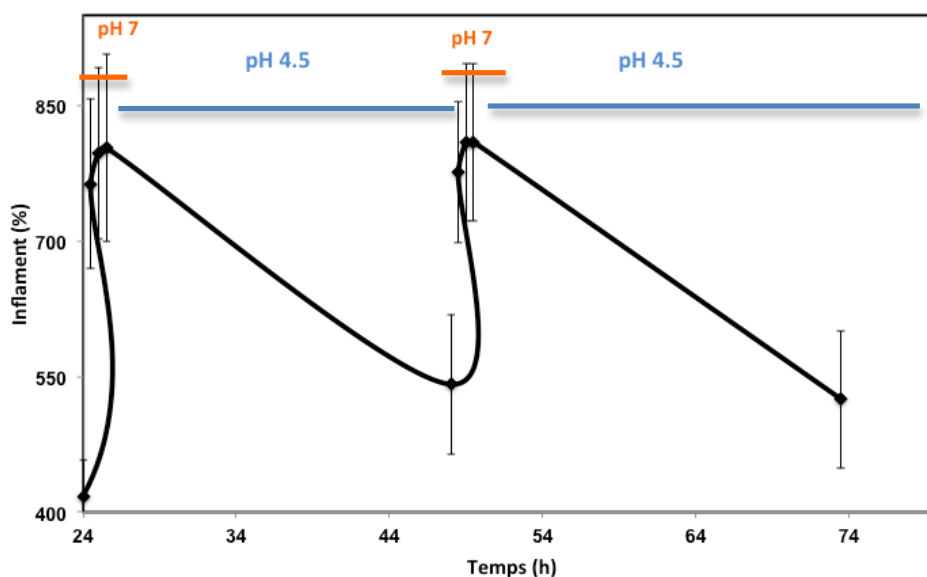


Figura 23. Perfil d'inflament de HPGGA-b2.5 amb canvis cíclics del pH del medi

Tal i com es mostra en la figura anterior, els temps per arribar a l'inflament màxim també varien segons el pH en el que es trobin les mostres. A pH neutre els HG assolixen el seu Q màxim en aproximadament 90 minuts mentre que són necessàries 24 hores per arribar al Q màxim en pH àcid. Torna a quedar en evidència que Q varia segons el pH en el que es trobi l'HG presentant un inflament més elevat com més bàsic sigui el medi tal i com s'ha pogut demostrar en l'assaig anterior.

La concentració iònica també té influència en el grau d'inflament que experimenten els HGs. A altes concentracions salines, el grau d'inflament és menor degut a les forces intermoleculars i als ponts d'hidrogen que es creen entre les molècules tal i com s'ha explicat anteriorment. A la **Figura 24** s'observa que durant el procés de síntesi, mitjançant l'addició de AED com agent entrecreuant, es formen cadenes totalment entrecreuades i altres cadenes parcialment entrecreuades. El primer cas és el que es dona amb major percentatge i poques cadenes queden parcialment entrecreuades tot i que no es poden ometre.

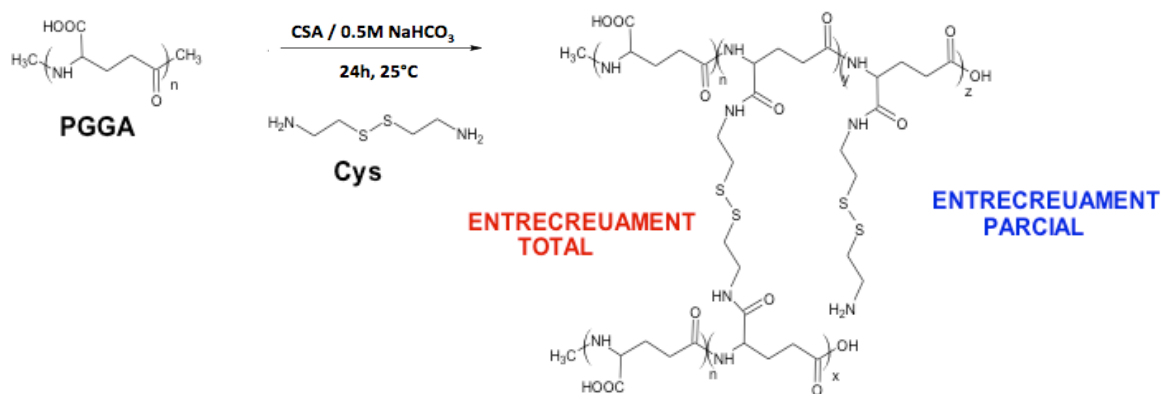


Figura 24. Síntesi d'hidrogels basats en PGGA i AED

En conseqüència, es va seleccionar una concentració salina elevada de 1.37M de NaCl en la solució tampó de PBS (pH 7.3). Treballant a aquesta elevada concentració es va aconseguir que la part superior de l'estructura no presentés un inflament desmesurat arribant al col·lapse de la conformació. A la **Figura 25.a** es pot observar l'inflament que es produeix a la part superior degut a la major superfície en contacte amb el medi respecte a la superfície de la base i a les tensions internes en l'HPGGA a causa d'aquest creixement. En la **Figura 25.b** s'observa el col·lapse i consegüent destrucció que va patir l'HG al cap de 2 hores de rentat en aigua destil·lada.

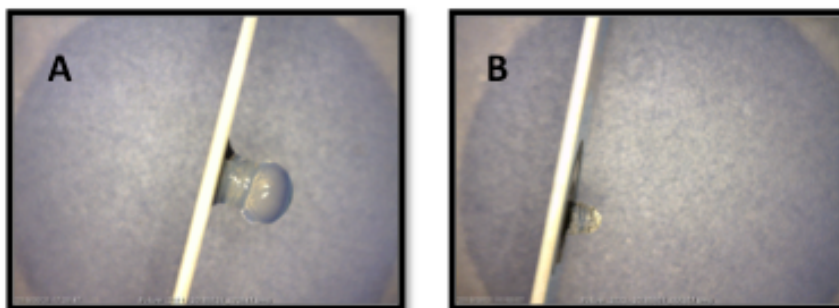


Figura 25. a) Evolució del grau d'inflament de HPGGA-b2.5 en aigua destil·lada
b) Hidrogel col·lapsat degut a l'inflament excessiu que ha patit al cap de 2 hores

5.1.3. Estudis d'incorporació i alliberament de dopamina des dels HPGGA

5.1.3.1. Estudi preliminar en la incorporació de la DA

Prèviament a realitzar la incorporació final de DA en els hidrogels, calia saber quina concentració i pH eren els òptims pel procés. Es va realitzar el següent estudi qualitatiu.

Segons el mètode 4.3.1.2.1, es van submergir en diferents solucions tampó, pH 2.2 i 4.5, i amb concentracions de DA diferents, 3 mg/ml i 6 mg/ml, a 10°C durant 4 hores. Els hidrogels que es van estudiar van ser HPGGA-b1.5, HPGGA-b2.5, HPGGA-b2.5* i HPGGA-b1.5*. La resposta que van patir les mostres es pot observar en la **Figura 26** i **Figura 27**.

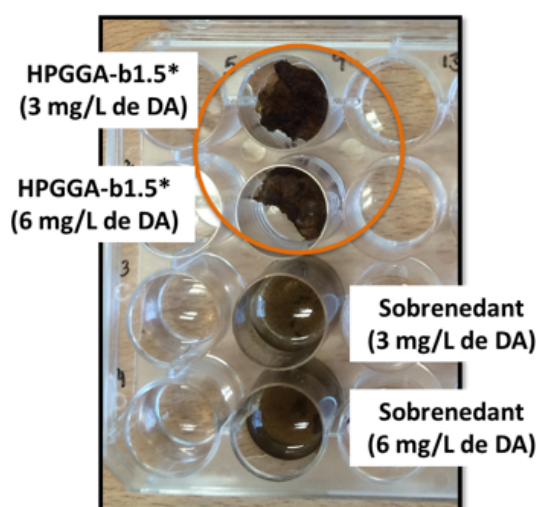


Figura 26. Mostres de HPGGA-b1.5* submergides en solucions 3mg/L i 6mg/L durant 4 hores i els seus respectius sobrenedants en medi de pH 2.2

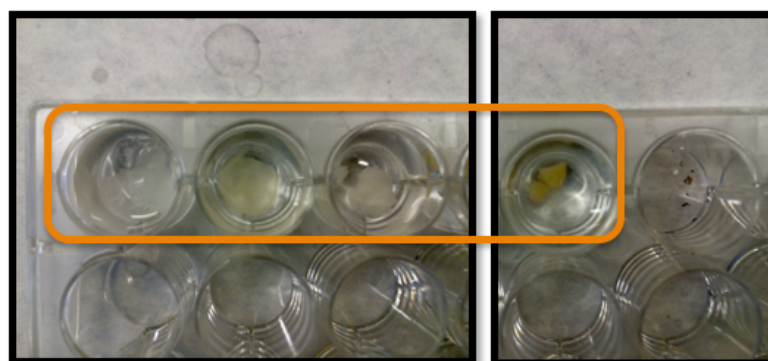


Figura 27. Mostres de HPGGA-b1.5, HPGGA-b2.5, HPGGA-b2.5 i HPGGA-b2.5* submergides en pH 4.5 (mostres laterals) i pH 2.2 (mostres centrals) transcorregudes 4 hores

Passades dues hores la DA incorporada en HPGGA-b1.5* a pH 2.2 mostrava evidents signes d'haver patit un procés d'oxidació, independentment de la concentració de DA (**Figura 26**). Tant els hidrogels com el sobrenedant on es trobava dissolta la DA mostraven un to negre que evidenciava l'oxidació d'aquesta. A partir d'aquesta observació es dedueix que la DA s'introdueix correctament en l'estructura polimèrica.

Els hidrogels de la **Figura 27** són, de dreta a esquerra, HPGGA-b1.5 (pH 4.5), HPGGA-b2.5 (pH 2.2), HPGGA-b2.5 (pH 2.2) i HPGGA-b2.5* (pH 4.5). Tots mostraven la coloració normal transcorregudes 4 hores independentment del pH en el que es trobessin submergits i de la concentració de DA. L'HPGGA-b2.5*, present en la **Figura 27**, pot semblar que hagi adquirit un to més groguenc que els altres, aquest fet no es deu a l'oxidació de la DA sinó al propi hidrogel que inicialment ja presentava aquesta coloració.

Finalment, es va seleccionar la solució tampó d'àcid cítric (pH 4.5) i una concentració de 6 mg/ml de DA per tal d'assegurar una càrrega alta per reduir possibles ineficiències del sistema.

5.1.3.1.1 Determinació de la concentració de DA

Per la determinació de la concentració que s'havia incorporat en els HPGGA es va analitzar el sobrenedant que les mostres no van poder absorbir degut a que ja havien assolit el seu màxim grau d'inflament Q. Si la concentració final de DA coincidia amb la que inicialment hi havia en el medi, 6 mg/ml DA, es podria assumir que aquesta es la concentració a l'interior de la xarxa polimèrica. Les mostres es van analitzar mitjançant UV-Vis.

Els resultats van ser positius, la concentració en els sobrenedants restants de l'inflament dels hidrogels coincidia amb la inicial. S'assumeix que els HPGGA contenen 6 mg/ml de DA una vegada assolit el màxim inflament.

5.1.3.2. Alliberament de DA en funció del pH del medi

A causa que la DA és una monoamina que s'oxida ràpidament quan es troba a un pH superior a 6, es va realitzar un estudi qualitatiu previ per analitzar el pH més bàsic al que es podia treballar amb un espai de temps suficient perquè els processos a estudiar es produïssin. Es desitjava que els assajos finals d'alliberació i detecció simultània es realitzessin a pH 7.3 per emular les condicions de la sang.

Les mostres que es van seleccionar per l'experiment corresponien a HPGGA-b1.5 i HPGGA-b2.5, totes les mostres contienien DA incorporada prèviament. Es van estudiar les respostes en solucions tampó de pH 6 i pH 7. Transcorregudes 24 hores l'aspecte de les mostres era el que es mostra en la **Figura 28**.

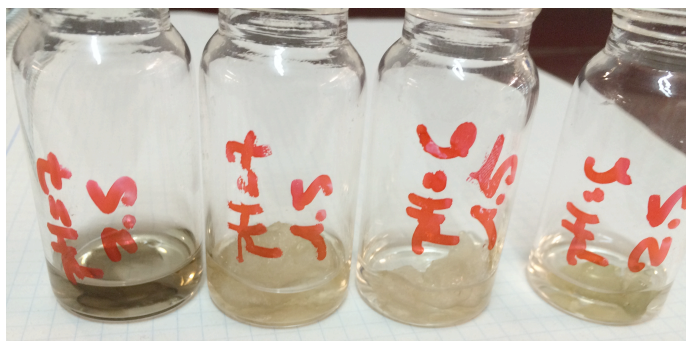


Figura 28. Mostres de HPGGA-b1.5/2.5 en medi de pH 6 i pH 7 transcorregudes 24 hores

L'aparença dels hidrogels va variar degut a l'inflament que van experimentar i al viratge de color provocat per l'oxidació de la DA. A pH neutre, la DA va patir una oxidació a les dues hores en l'hidrogel HPGGA-b2.5 (esquerra de la **Figura 28**); en el HPGGA-b1.5, al cap d'un dia ja es podia observar un to marronós en la mostra. En la solució de pH 6 la DA va trigar més temps en oxidar-se, sent un temps suficient per poder realitzar els assajos correctament.

Es va poder observar que en la mostra HPGGA-b2.5 a pH 7.3, on la DA va patir una oxidació més ràpida, es va formar un cercol d'un to més intens en la zona exterior de l'hidrogel, **Figura 29**. Aquest fet mostra l'efecte tap que es produeix quan la concentració de fàrmac és suficientment elevada en la zona més externa de l'hidrogel per no permetre l'expulsió de més DA cap a l'exterior formant-se una alta acumulació de producte que queda retingut dins de la zona més perifèrica de l'estructura.

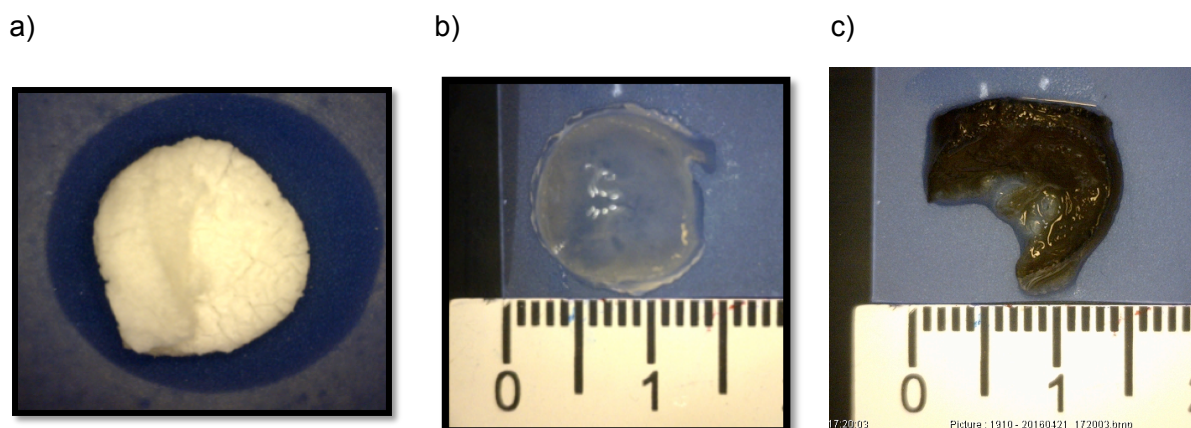


Figura 29. HPGGA-b2.5 en diferents estats: a) HPGGA liofilitzat durant 48 hores. b) HPGGA hidratat amb aigua destil·lada durant 24 hores. c) HPGGA hidratat durant 24 hores en medi de pH 7.3 amb DA incorporada prèviament en la xarxa polimèrica.

Finalment, es va optar per realitzar les alliberacions del dispositiu final en la solució de fosfats a pH 7.3. L'elecció va ser presa en base a la voluntat d'aproximar les condicions d'alliberació a les més reals possibles.

5.1.3.2.1 Determinació de l'alliberament de DA en medi àcid

Amb l'objectiu de dur a terme l'estudi de l'alliberament del principi actiu, aquest va ser prèviament incorporat en diferents HPGGA: HPGGA-b1.5, HPGGA-b2.5, HPGGA-a2.5, HPGGA-b1.5*, HPGGA-b2.5*, HPGGA-a1.5* i HPGGA-a2.5*. Les figures **Figura 30** i **Figura 31** mostren els perfils d'alliberació de DA segons el pes molecular de PGGA i el grau d'entrecreuament de la matriu. L'alliberació es va dur a terme en solució d'àcid cítric (pH 4.5) i es va fer el seguiment mitjançant UV-Vis.

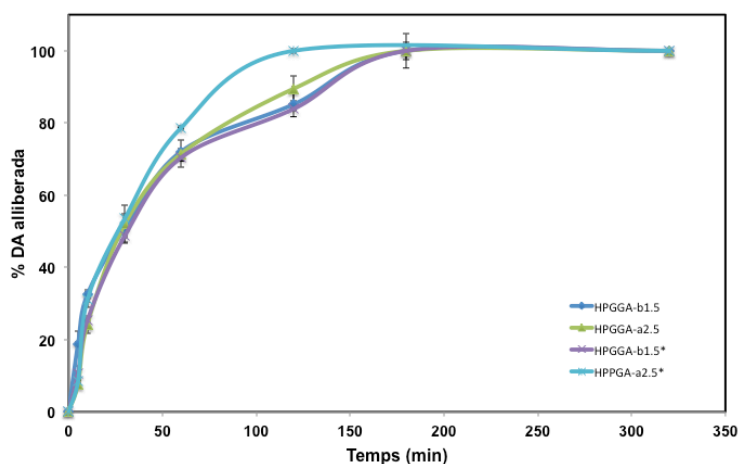


Figura 30. Perfil d'alliberació ràpida corresponent a HPGGA-b1.5, HPGGA-a2.5, HPGGA-b1.5* i HPGGA-a2.5* a pH 4.5, temperatura 25°C i amb agitació.

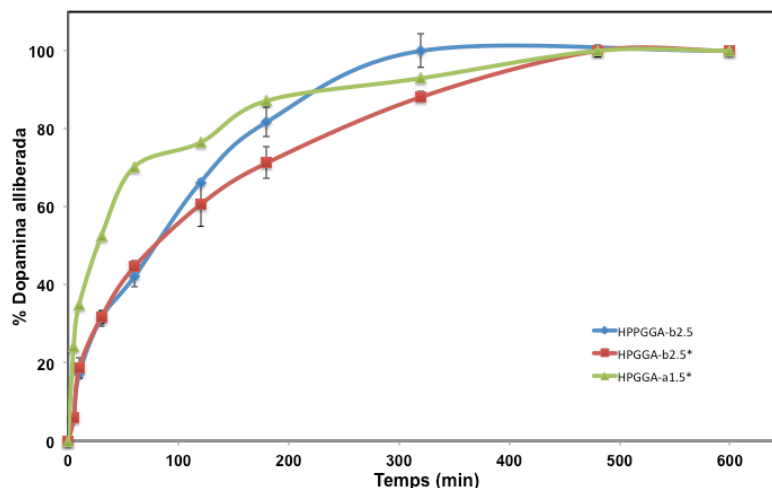


Figura 31. Perfil d'alliberació lenta corresponent a HPGGA-b2.5, HPGGA-b2.5* i HPGGA-a1.5* a pH 4.5, temperatura 25°C i amb agitació.

Com es pot observar, el tipus d'alliberacions es poden dividir en dos grups segons la velocitat d'alliberació en que es produeixen.

D'una banda els HPGGA-b1.5, HPGGA-a2.5, HPGGA-b1.5* i HPGGA-a2.5* mostren una alliberació ràpida arribant al 100% de DA alliberada en 3 hores i del 80% en 2 hores. El HPGGA-a2.5* mostra una alliberació més ràpida que els altres tres, havent alliberat la totalitat de la DA en 2 hores, moment en que els altres s'han després el 80% de la càrrega. Tal i com reflecteixen els resultats obtinguts, el tipus de carbodiimida utilitzada en la producció dels hidrogels no representa un factor que influeixi en el procés d'alliberament ja que les parelles d'hidrogels amb diferent carbodiimida mostren iguals perfils.

D'altra banda, el grup de HPGGA-b2.5, HPGGA-b2.5* i HPGGA-a1.5* mostren alliberacions més lentes amb un 100% de DA alliberada entre les 6 i 8 hores.

Finalment, es va seleccionar el HPGGA-b2.5 per la seva fàcil manipulació i pel perfil d'alliberació, el qual s'ajusta als requeriments del sistema.

5.2. Elèctrode serigrafiat de carboni modificat amb PEDOT/GA/HPGGA

5.2.1. Selecció de les condicions experimentals òptimes per la preparació del HPGGA

De tots els HG estudiats en els assajos precedents es va seleccionar finalment el HPGGA-b2.5. Es va escollir aquest hidrogel per dos motius principals: el temps de reacció en que es produïa l'entrecreuament era suficientment elevat per permetre la manipulació de la substància i el baix entrecreuament produïa una alliberació de DA adequada.

Un dels factors limitant a l'hora de dipositar l'HG sobre l'àrea de WE era les reduïdes dimensions d'aquest: WE presenta un diàmetre de 4 mm, veure **Figura 32**. Fins que l'hidrogel no està entrecreuat presenta un estat líquid, fet que va obligar a utilitzar un motlle per donar la forma cilíndrica desitjada i fer la funció de barrera de contenció.



Figura 32. Elèctrode DropSens DS150

En els primers assajos es va emprar un motlle de PS de 5 mm de diàmetre, el qual es va adherir sobre l'elèctrode gràcies a una pasta modelable d'argila plàstica. Els resultats no van ser els esperats degut al creixement excessiu de l'HG a l'hora de fer el rentat: les mostres ocupaven una superfície superior a la disponible del WE arribant fins i tot a sobre sortir de l'àrea total del dispositiu. Per reduir les dimensions de l'HG es va optar per crear uns motlles de tefló amb un orifici central de 2 mm de diàmetre i 2 mm de profunditat (**Figura 33** i **Figura 34c**). Amb una xeringa es va injectar l'PGGA-AED, encara en estat líquid, sobre la capa de GA prèviament dipositada creant el conjunt GA-HPGGA de la **Figura 34d** al cap de 24 hores. Finalment es van obtenir els resultats desitjats: l'àrea que s'ocupa només representa un 25%

de la superfície total del WE; tot i el grau d'inflament que experimenten els HG després del rentat (en aigua destil·lada) segueix havent àrea del sensor lliure, veure **Figura 33B**. Com es pot observar en la **Figura 33B-2**, l'HG adquireix una forma arrodonida en forma de semi esfera a la part superior a causa de les tensions exercides entre el motlle i l'estructura en creixement com s'esquematitza en la **Figura 35** i **Figura 34E**. Aquesta geometria és beneficiosa perquè en l'espai proper al WE existeixen corrents que ajuden a la homogeneïtzació del medi fent que les mesures siguin més precises.

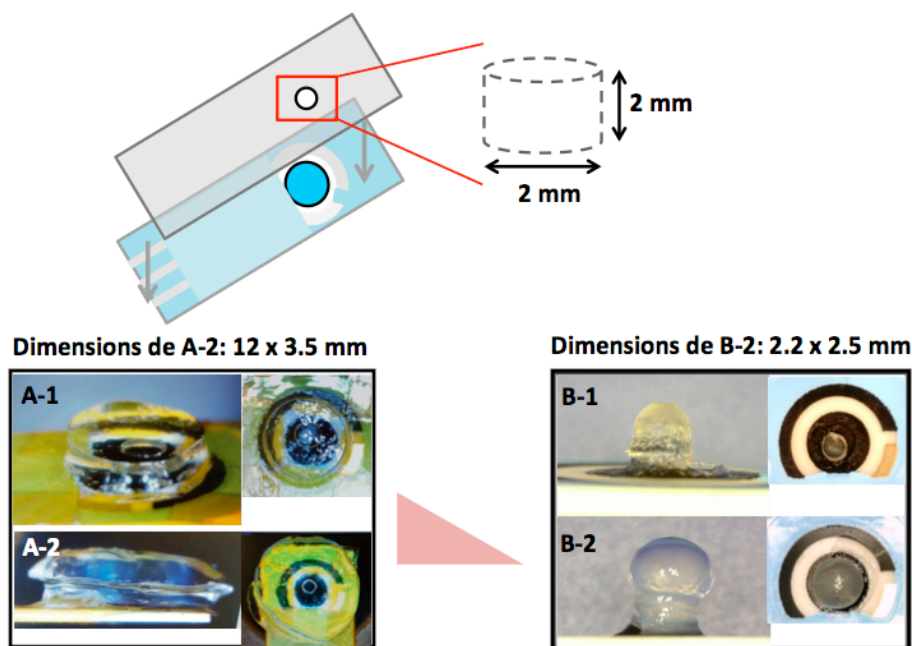


Figura 33. Dimensions inicials per a l'addició de GA/HPGGA: A (3 x 5 mm), B (2 x 2 mm) A-1) i B-1) pre-rentat, i A-2) (12 x 3.5 mm) i B-2) (2.2 x 2.5 mm) post-rentat amb aigua destil·lada.

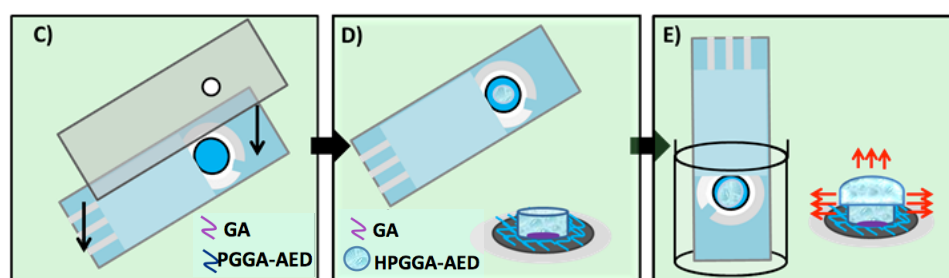


Figura 34. Etapes de preparació de GA-HPGGA: c) Aïllament plàstic (p.e. Tefló) de la zona de treball, d) Incorporació de gelatina en la zona de treball, i seguidament PGGA-AED, e) Rentat del HPGGA, i posterior immersió en medi àcid

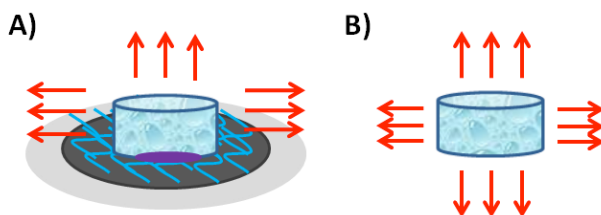


Figura 35. Tipus d'inflament en hidrogels amb geometria cilíndrica: A) adherit a una superfície i B) no adherit.

5.2.1.1. Determinació del grau d'entrecreuament

Mitjançant l'espectròmetre d'infraroig per transformada de Fourier (TF-IR) es va determinar qualitativament el grau d'entrecreuament del HPGGA-b2.5 dipositat sobre l'ESC modificat amb el recobriment de PEDOT.

Es va obtenir el seu espectre el qual es compara amb el del polímer de baix pes molecular emprat per a la seva síntesi, **Figura 36**.

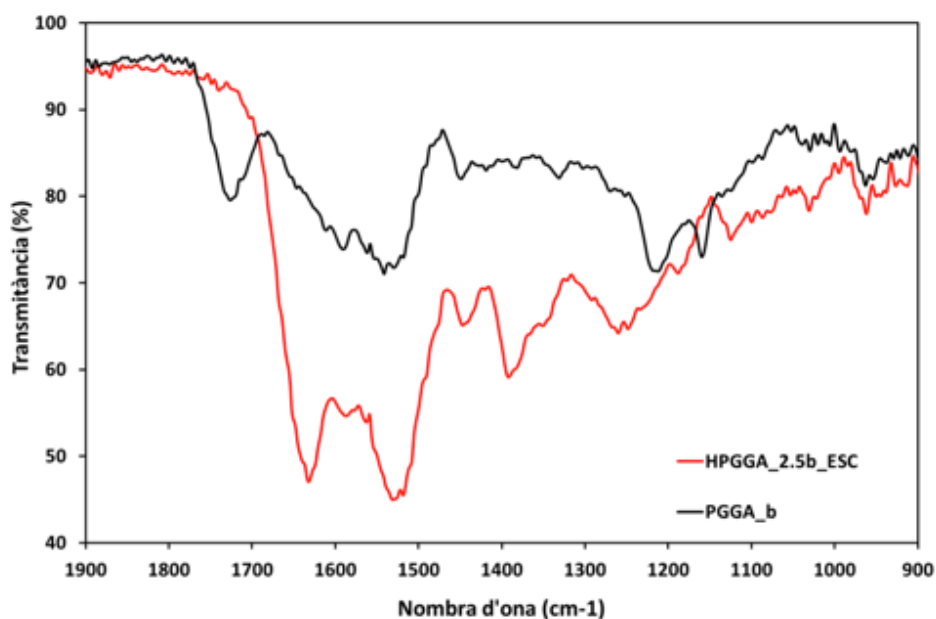


Figura 36. Espectre TF-IR de PGGAb i HPGGA2.5b.

Es pot observar la desaparició del senyal pertanyent a l'àcid carboxílic -COOH i l'aparició del grup de l'àcid carboxílic ionitzat. El senyal de l'amida primària (-NH-CO-) no es veu afectat, en contra del que succeeix en l'amida secundària (-NH-CO) que pateix una disminució en la longitud d'ona de l'espectre passant de 1540 a 1528 cm^{-1} . En la següent

Taula 7 es resumeixen les freqüències de l'infraroig esmentades.

	Àcid carboxílic (v. tensió; -COOH)	Àcid carboxílic ionitzat (v. tensió; -COO ⁻)	Amida I (v. tensió; -NH-CO-)	Amida II (v. deformació; -NH-CO-)
PGGA-b	1725	-	1590	1540
HPGGA-b1.5_ESC	-	1631	1586	1528

Taula 7. Freqüències d'infraroig (cm^{-1}) de PGGA-b i HPGGA-b2.5_ESC

5.2.1.2. Caracterització morfològica de HPGGA

Per poder caracteritzar morfològicament l'HPGGA-b2.5 en diferents àrees de la seva totalitat, es va emprar el microscopi electrònic de rastreig (MER). Les imatges de HPGGA-b2.5 dipositat sobre el recobriment de PEDOT s'indiquen en la **Figura 37**.

En les imatges MER obtingudes es pot observar en a) i b) la zona inferior i superior del HPGGA-b2.5, respectivament. Les imatges d'aquesta secció es van obtenir realitzant un tall transversal a la mostra. En la zona inferior es pot percebre una àrea central circular pertanyent a la gota de GA, dipositada entre el film de PEDOT i l'HPGGA, que actuava com punt d'ancatge del HPGGA a l'elèctrode. En la zona superior es pot apreciar la forma creixent que es produeix en l'hidrogel degut a l'ús del motlle.

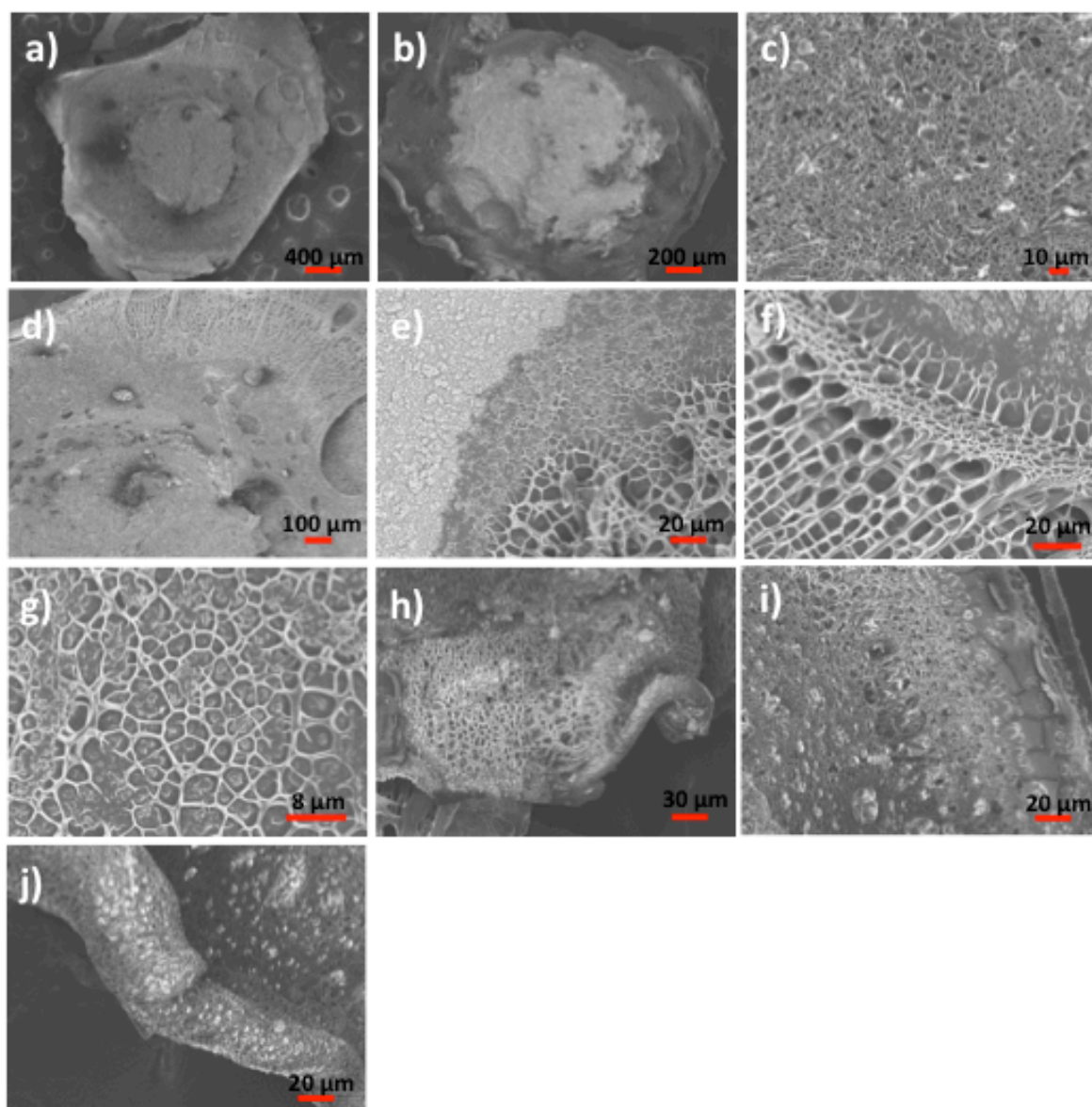


Figura 37. Imatges MER del ESC-PEDOT/GA/HPGGA-b2.5. (a) part inferior; b) part superior, c) estructura interna del HPGGA-b2.5; d), e), f) i g) zona de HPGGA-b2.5 + GA en contacte amb el PEDOT; h), i) i j) zones de la part superior del HPGGA-b2.5).

En la imatge c) es mostra l'estructura interna de l'HPGGA-b2.5. Es poden observar els porus del material, els quals varien entre 1 i 7 μm aproximadament. El material no segueix cap tipus de patró en l'estructura.

Les imatges d), e), f) i g) mostren la zona de transició entre l'HPGGA-b2.5 amb la GA i el recobriment de PEDOT. La primera d'elles, imatge d), és una visió global, on ja es pot apreciar el canvi en la morfologia dels porus els quals no es mostren tant compactes com en la imatge c). En les tres fotografies posteriors, e), f) i g), es mostra en detall la zona perimetral de PEDOT/GA/HPGGA-b2.5. En la imatge e) es diferencien les tres zones gràcies al canvi de color entre el PEDOT i la GA, sent més clar el primer; en la part central es veu l'estructura porosa de l'hidrogel. En la següent imatge f) s'aprecia la tensió que s'exerceix sobre els porus degut a la força que practica el propi hidrogel per adherir-se a la superfície. Es poden observar les fibres més extremes en forma de tentacles les quals milloren l'adhesió. En conseqüència a l'aparició d'aquestes tensions, els porus presenten un diàmetre més gran al voltant dels 10 μm i una estructura més oberta que la que es mostra en la imatge c).

En les darreres tres imatges del conjunt, es van fotografiar les vores de la zona de la cúpula que es forma en la part superior de l'hidrogel aquestes presenten formes ondulades degut a la tensió que provoca el motlle i el creixement de l'hidrogel.

Per tant, les mostres presenten porus més petits i tancats a la zona interior de l'hidrogel i canals més amplis i estirats conforme s'apropa a la zona exterior per on s'adhereix a la superfície amb el recobriment PEDOT creant-se grans tensions que provoquen aquesta geometria.

5.2.2. Selecció del mètode de preparació del film de PEDOT

Com s'ha desenvolupat prèviament, el PEDOT és un polímer conductor adient per la preparació de films en dispositius elèctrics gràcies a les propietats electroquímiques que presenta.

L'optimització de la preparació dels films va succeir en dues etapes. En els primers assajos es va emprar poli(3,4-etilendioxitiòfè)-poli(estirensulfonat) (PEDOT-PSS, Sigma, 3-4% concentrat en aigua). Es van dipositar 10 μL del producte sobre la superfície del WE cobrint-la totalment. El polímer es va deixar assecar a temperatura ambient durant 24 hores i posteriorment es va curar a 70°C durant 1 hora. No es van obtenir resultats favorables quan

es va introduir el dispositiu ESC-PEDOT/GA/HPGGA-b2.5 en el liofilitzador, el film de carboni serigrafiat. Aquest fet no presentava un inconvenient ja que no era primordial per tal d'incorporar la DA. El major inconvenient va ser quan els films van començar a mostrar senyals de despreniment quan restaven més de 12 hores en solució tampó (pH 4.5). Aquest fet no permetia conservar les mostres en bon estat, i per aquest motiu es va descartar.

En un segon assaig, es recobrir la superfície amb PEDOT generat electroquímicament mitjançant cronoamperometria, segons el mètode 4.3.2.1.2. El canvi de color de gris fosc a negre intens indicava que la superfície estava polimeritzada com es mostra en la **Figura 38**. Amb aquesta tècnica el polímer s'adheria correctament sense presentar despreniments ni degradació.



Figura 38. Elèctrode DS150 amb l'elèctrode de treball recobert amb film PEDOT

5.2.2.1. Caracterització morfològica del film PEDOT

Per tal de conèixer la morfologia dels films de PEDOT dipositats sobre la superfície del WE es va emprar el MER. La **Figura 39** mostra la superfície de l'elèctrode que es recobrirà amb PEDOT. S'observa una estructura laminar sense cap patró. Les làmines presenten mides i formes diverses.

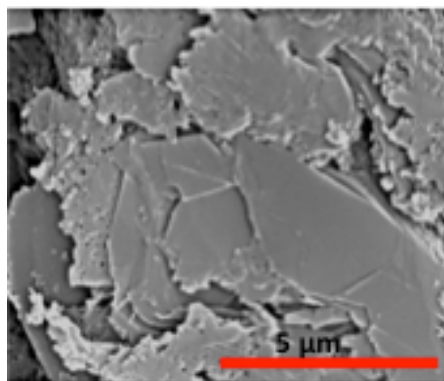


Figura 39. Imatge MER de la superfície de ESC

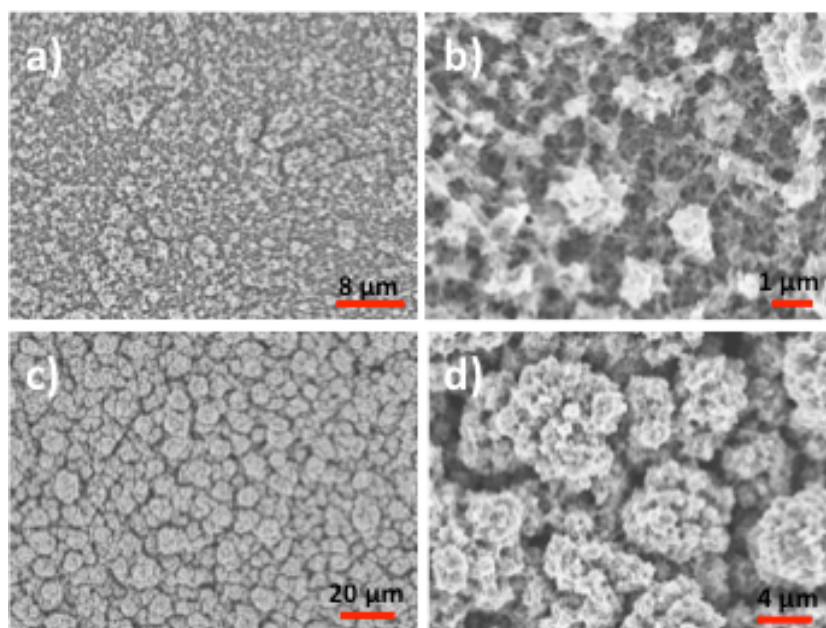


Figura 40. Imatges MER del recobriment de PEDOT generat electroquímicament sobre la superfície de l'elèctrode de: a) i b) carboni; c) i d) platí

Les imatges MER indicades en la **Figura 40** es van prendre en diferents superfícies: les dues imatges superiors (a i b) van ser preses sobre la superfície de carboni del WE, en canvi, les dues inferiors mostren el recobriment PEDOT sobre l'elèctrode de Pt. No s'observa una diferencia significativa en la morfologia adquirida pel recobriment en funció del material de l'elèctrode; simplement sobre el Pt es diposita una major quantitat de polímer, adquirint una morfologia més esfèrica que la que es presenta sobre el carboni la qual s'estén més sobre la superfície. El film dipositat presenta un gruix de 500 nm aproximadament.

5.2.3. Determinació de les propietats electroquímiques de l'elèctrode modificat

Per determinar les propietats electroquímiques de l'elèctrode modificat s'ha estudiat la pèrdua d'electroactivitat que presenten els HPGGA-b2.5. Es van realitzar cinc cicles d'oxidació i reducció a cada mostra obtenint-se els resultats de la **Figura 41**.

La pèrdua d'electroactivitat del sistema es va determinar a partir de l'equació:

$$Q^+(\%) = \frac{Q_f^+ - Q_i^-}{Q_i^+} \times 100$$

Equació 3. Expressió per la determinació de pèrdua d'electroactivitat (%)

On Q_f^+ és la càrrega aniónica final i Q_i^- és la càrrega catiónica en l'instant de temps i. El càlcul per la càrrega aniónica s'efectua emprant la mateixa expressió.

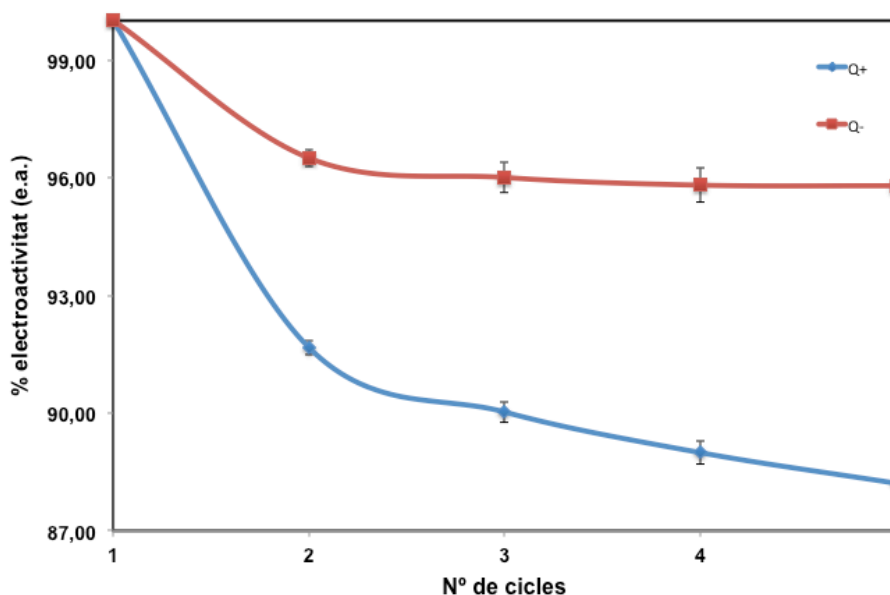


Figura 41. Perfil de la pèrdua d'electroactivitat del sistema

Nota 1. Q^+ : càrrega coulòmbica aniónica; Q^- : càrrega coulòmbica catiónica

Es pot observar que la pèrdua d'electroactivitat catiónica és millor que la aniónica ja que la primera té un descens d'un 4% en cinc cicles en contra de la baixada del 12% en el mateix nombre de voltes. També es fa notar que Q^+ s'estabilitza en el quart període a diferència de Q^- , on l'electroactivitat segueix descendant encara en el cinquè cicle.

Normalment els polímers conductors tenen tendència a disminuir de manera acusada la seva capacitat d'oxidació a mesura que es realitzen cicles d'oxidació-reducció.

5.2.4. Estudis d'incorporació i alliberament de DA

S'ha estudiat la incorporació de DA als ESC-PEDOT/GA/HPGGA-b2.5 mitjançant un mètode diferent al que s'ha empleat per introduir DA a les pastilles d'HPGGA-b2.5 tal i com s'explica en el mètode 4.3.1.3.1. Aquesta diferència radica en el fet que la capa de PEDOT dipositada sobre l'àrea de l'elèctrode no resistia al procés de liofilització dels HG: el film de PEDOT no tenia suficient adhesió a la superfície. Finalment es va optar pel mètode d'absorció submergint els HG no liofilitzats en un tampó d'àcid cítric (pH 4.5) amb una concentració de DA de 6 mg/ml (**Figura 42F**) fins que s'assolia l'equilibri per osmosi al cap de 24 hores. El medi en el que es va dissoldre la DA era àcid ja que a pHs més bàsics la molècula pateix una degradació per oxidació. Es va procedir al rentat en solució de PBS per eliminar la DA en excés en la superfície de l'HPGGA (figura **Figura 42G**). La següent **Figura 42** esquematitza el procés:

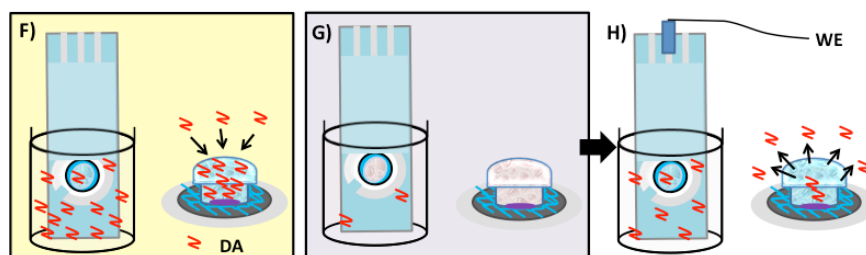


Figura 42. Etapes d'incorporació, alliberació i detecció de DA: f) Incorporació de DA, g) Rentat de ESC-PEDOT/GA/HPGGA en medi neutre i h) Alliberació i detecció electroquímica simultània de DA.

Els estudis d'alliberament de DA en ESC-PEDOT/GA/HPGGA-b2.5 s'han dut a terme durant 60 minuts en medi neutre amb solució tampó fosfatada PBS a pH 7.3 per tal d'emular les condicions de la sang (**Figura 42G**). L'alliberació es va realitzar segons el procediment descrit en l'apartat 4.3.1.3.2. La detecció durant l'alliberació és va realitzar simultàniament mitjançant CVs (velocitat d'escombrat de 50 mV amb rang de potencial de -0.4 a 0.6 V) i UV-Vis. Es van obtenir els resultats de la **Figura 43**, on es mostra l'evolució de la concentració de DA en el medi i la concentració detectada pel ESC-PEDOT/GA/HPGGA-b2.5 que contenia DA (sensor H). En el mateix gràfic es pot observar una tercera corba representant l'evolució de la concentració de DA que detecta el sensor de control (sensor C); el qual no contenia DA en la seva estructura.

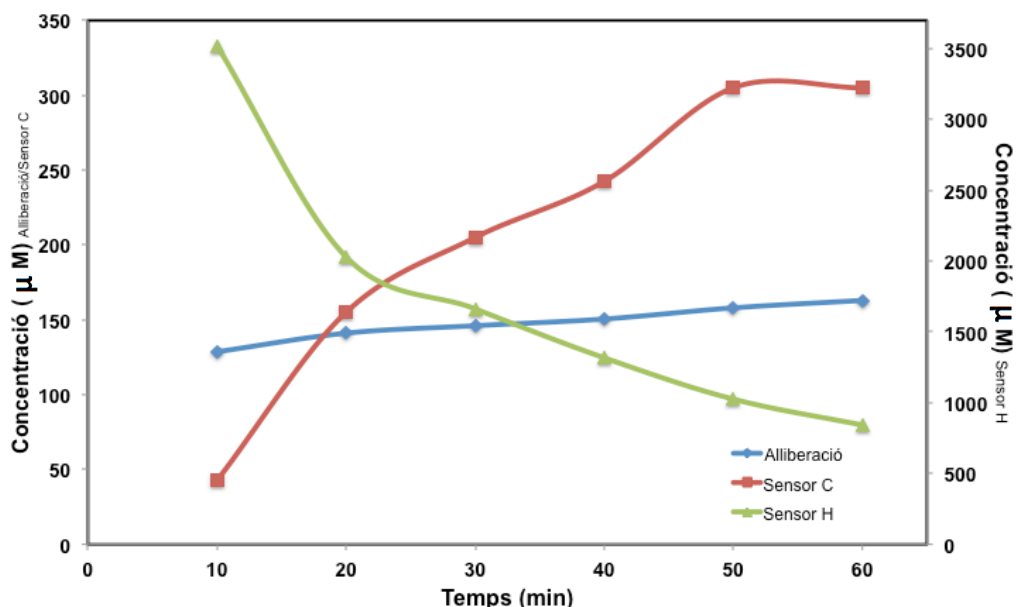


Figura 43. Perfils d'evolució de la concentració de DA alliberada en blau, de la detectada pel sensor lliure de DA en vermell i la detectada pel sensor amb l'HPGGA en la seva superfície en verd

Com s'observa en la figura anterior tant la concentració en el medi (seguida mitjançant UV-Vis) i la detectada pel sensor C augmenta amb l'avanç del temps. Aquesta tendència és d'esperar com a evidència que l'expulsió de DA des de l'HG cap al medi s'està produint. Cal destacar que la concentració detectada pel sensor C (corba vermella) és superior a la concentració de DA present en el medi (corba blava). Aquest fet pot ser provocat per l'afinitat entre la DA i la superfície de carboni del sensor amb la capa de PEDOT que induiria a una acumulació del fàrmac sobre l'àrea de control. Si s'observa, la corba del sensor C s'aproxima a un acumulat de la concentració detectada en el medi. A partir del minut 50 la corba del sensor de control C no augmenta, havent arribat així a una possible saturació de la superfície detectora. Aquest fet sumat a l'ús de dues tècniques de detecció diferents i els errors humans comesos durant les mesures poden provocar incongruències si no es realitza un anàlisi més acurat dels resultats. Aquest és un dels punts que cal estudiar amb més profunditat per trobar millores en futurs estudis per l'optimització del dispositiu. La tercera corba, corresponent al sensor H, presenta un pendent negatiu. Aquesta tendència és d'esperar ja que representa la concentració de DA a l'interior de l'hidrogel: conforme avança el procés d'alliberació la DA restant dins de l'estructura disminueix ja que s'ha entregat al medi. Per als sensors C i H es van emprar tècniques potenciomètriques.

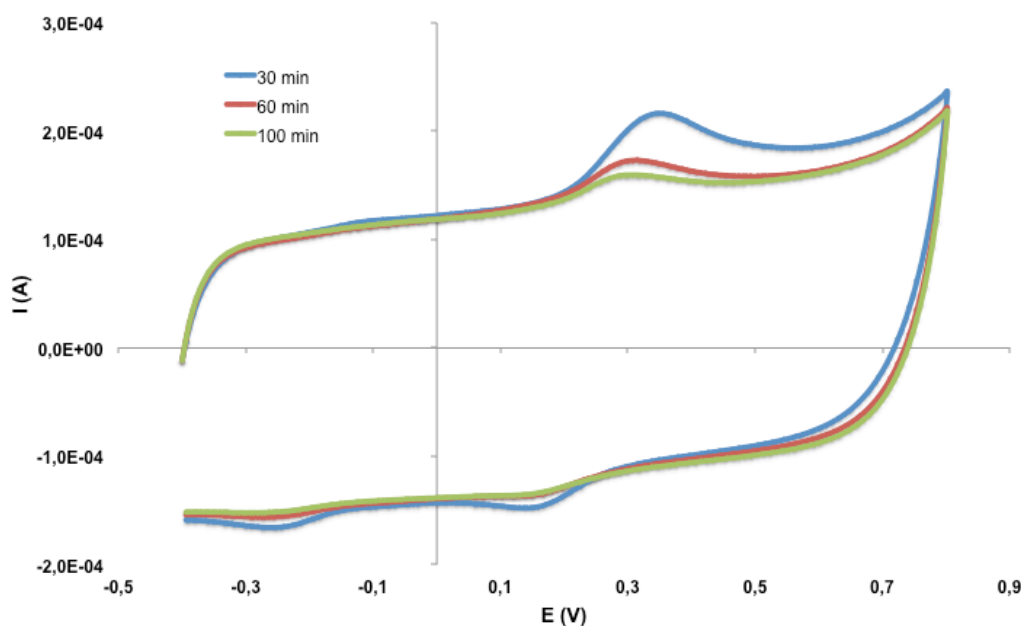


Figura 44. Evolució de les corbes obtingudes per CVs durant l'alliberació de DA del ESC-PEDOT/GA/HPGGA-b2.5 als 30, 60 i 100 minuts del procés.

La **Figura 44** mostra l'evolució de les corbes realitzades per CV a diferents instants d'un procés d'alliberació en el sensor H. En els primers minuts s'observa un pic intens al voltant de 380 mV que va disminuint d'intensitat amb el progrés de l'alliberació. Aquesta resposta és d'esperar ja que la concentració de DA en el si de l'hidrogel va disminuint d'igual manera que ho fa el senyal en la capa de PEDOT.

En la **Figura 45** queda palès com disminueix la intensitat en el sensor H durant l'alliberació recolzant els resultats de la figura anterior.

Un fet a destacar és l'aparició d'un segon pic, el qual no es mostra, d'intensitat en sentit anòdic, a 0,1 V, juntament amb el màxim local esperat corresponent a la senyal de DA. Aquest pic augmentava de valor amb l'avanç de l'alliberació. Aquest fet va succeir en el 50% de mostres. Es va preparar un assaig per esclarir el motiu d'aquesta actuació. Es va realitzar una alliberació controlada per CV tal i com s'ha explicat anteriorment, la diferencia en el sensor de control (sensor C) que es va utilitzar: un ESC sense film de PEDOT, per tant el carboni de la superfície estava en contacte directe amb la solució tampó de PBS on s'alliberava la DA continguda en l'HPGGA-b2.5. Quan es van estudiar les CVs corresponents al sensor C es va observar l'aparició de dos pics amb les mateixes

característiques que els anteriors. Cal recordar, que aquest capa no és un superfície impermeable ni impenetrable ja que la seva estructura està constituïda per filaments entrecreuats de polímer formant una xarxa. Entre els espais d'aquesta poden introduir-se molècules de DA que en contacte amb el carboni del ESC provoquen la senyal no esperada degut al contacte grafit-DA. En la **Figura 44** ja s'havia suggerit la mateixa explicació de l'alta afinitat entre l'àrea del WE del sensor C i la DA per justificar una detecció de DA superior als valors d'alliberació. Per tant, l'aparició inesperada d'un segon pic d'intensitat reafirma l'anterior desenvolupament.

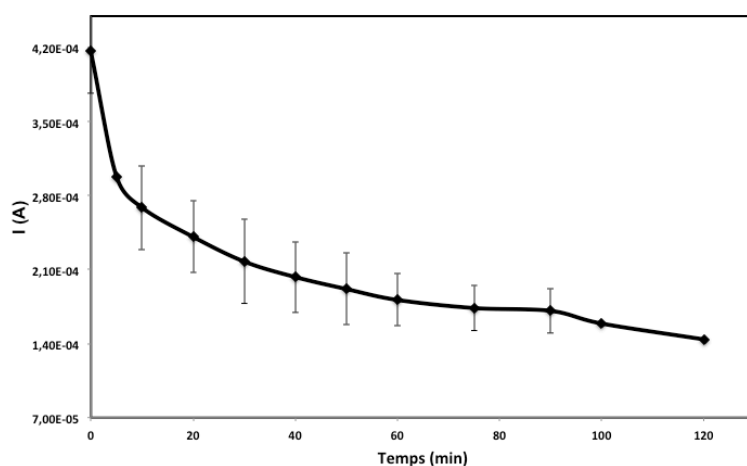


Figura 45. Evolució del perfil d'intensitat en el sensor H durant el procés d'alliberació

En la **Figura 46** es mostra un espectre UV-Vis de DA 200 μM . S'observa un pic a una absorbància de 280 nm corresponent a la senyal de DA present en la solució tampó de citrat a pH 4.5 (utilitzada per obtenir la recta de calibratge) on es va produir l'alliberació. Totes les corbes obtingudes per espectrometria d'UV-Vis mostren el mateix perfil variant la intensitat del pic seguint l'expressió de Lambert-Beer.

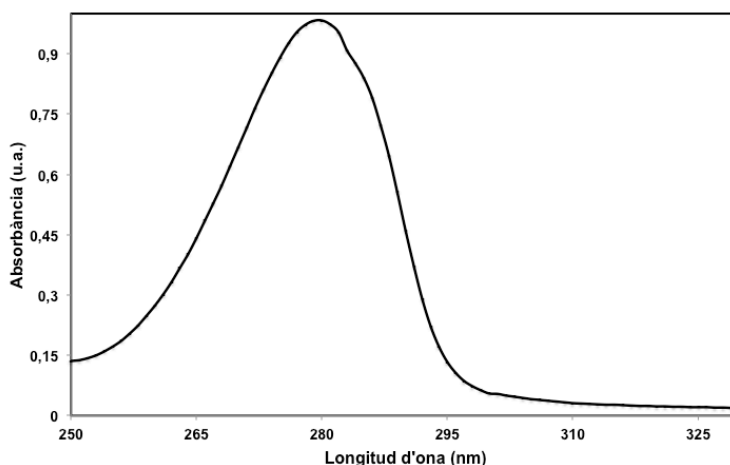


Figura 46. Espectre UV-Vis corresponent a un senyal de 475 μM de DA

Anteriorment s'ha comentat l'efecte tampó que es produïa durant l'alliberament de DA en les mostres en forma de pastilles. En el cas de l'HPGGA-b2.5 dipositat sobre l'ESC-PEDOT/GA presenta unes dimensions suficientment reduïdes per a que aquest efecte sigui negligible. Per tant, no es produeix l'obturació de la xarxa en la zona més externa.

Es va determinar si l'estimulació electroquímica és un factor que influeix en l'alliberació: es van submergir diferents mostres en solució tampó fosfatada PBS (pH 7.3) mantenint les mateixes condicions; en un grup d'elèctrodes es va controlar l'alliberació mitjançant UV-Vis i potenciostat, a diferència del segon grup on només es va seguir el procés prescindint de l'estimulació electroquímica. De la **Figura 47** es dedueix que l'estimulació electroquímica provocada pel potenciostat a l'hora de realitzar les mesures no alteren la cinètica d'alliberació en els hidrogels ja que les dues poblacions estudiades presenten un perfil d'alliberació igual.

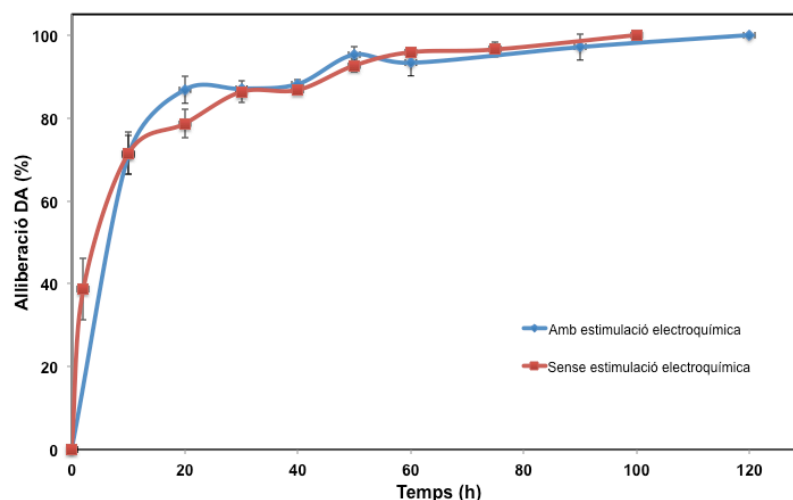


Figura 47. Evolució del perfil d'alliberació amb i sense estimulació electroquímica (corba blava i vermella respectivament)

5.2.4.1. Sensibilitat i límit de detecció de l'elèctrode modificat

Per determinar el límit de detecció (LD) del PEDOT s'utilitza l'expressió següent, **Equació 4**:

$$LD = (3.3 \times \sigma) / S$$

Equació 4. Expressió per calcular el límit de detecció del PEDOT

On σ és la desviació estàndard de la recta de calibratge de la DA i S és el pendent de la mateixa recta, **Figura 13**.

Per tant, s'obté un límit de detecció de l'elèctrode modificat de $0,45 \mu\text{M}$.

La sensibilitat es pot definir com la mínima magnitud en el senyal d'entrada necessari per produir una determinada magnitud en el senyal de sortida. En una corba de calibratge la sensibilitat queda representada pel pendent de la recta. En la **Figura 13** s'ha mostrat dita recta amb un pendent, per tant d'una sensibilitat, de $8 \cdot 10^{-5} \text{ mA} / \mu\text{M}$.

CAPÍTOL 6. ESTUDI ECONÒMIC

6. Estudi econòmic

A continuació es presenta la valoració econòmica del projecte. El pressupost es basa en els costos que representen el personal a càrrec de l'estudi, el lloguer dels equips i el cost del material i reactius que han sigut necessaris durant tots els processos. S'ha de tenir en compte que els càlculs són de caràcter aproximat.

6.1. Cost de personal

Per aquest càlcul es tenen en compte les persones implicades en les diferents fases del projecte. S'ha fet un càlcul segons les hores invertides en l'estudi; tant en la realització experimental com en la part de redacció i supervisió del projecte. A continuació s'adjunta la taula:

Cost de personal			
Concepte	Quantitat (h)	Preu unitari (€/h)	Cost (€)
Enginyer Júnior	400	15	6000
Doctor	100	25	2500
TOTAL			8.500,00

Taula 8. Resum de costos de personal

6.2. Cost de lloguer d'equips

En aquest apartat es tindrà en compte el cost que suposa el lloguer dels equips per fer els estudis d'anàlisi i caracterització de les mostres. En la següent taula queden reflectits dits costos:

Cost de lloguer d'equips			
Concepte	Quantitat (h)	Preu unitari (€/h)	Cost (€)
UV-Vis	15	30,00	450,00
TF-IR	5	70,50	352,5
Potenciostat	10	30,00	300,00
MER	5	65,00	325,00
TOTAL			1.427,50

Taula 9. Resum de costos de lloguer d'equips

6.3. Cost de reactius i materials

En aquest apartat s'ha tingut en compte el cost dels reactius necessaris per a poder realitzar en la seva totalitat l'estudi i el material de laboratori emprat per dur-lo a terme.

A continuació es mostren les dues taules amb els costos associats:

Cost de reactius i material			
Concepte	Preu	Quantitat	Cost (€)
PGGA	158,50 €/envàs	20 %	31,70
CSA	399,00 €/envàs	70 %	279,3
AED	48,80 €/envàs	10 %	4,88
KCl	76,90 €/envàs	5 %	3,85
NaCl	34,80 €/envàs	10 %	3,48
NaHPO ₄	48,80 €/envàs	5 %	2,44
KH ₂ PO ₄	295,00 €/envàs	3 %	8,85
Àcid cítric	91,70 €/envàs	2 %	1,83
Citrat de sodi	295,00 €/envàs	1 %	2,95
Àcid clorhídric (37%)	47,90 €/envàs	0,1 %	0,05

Gelatina porcina	116,50 €/envàs	1 %	1,16
Material laboratori			800
Dropsens®	2,60 €/u	15 u	39
TOTAL			1.179,49

Taula 10. Resum de costos de reactius i materials

6.4. Cost total del projecte

En el cost total s'engloben els tres conceptes anteriorment descrits així com un 10% en concepte de despeses generals. El cost total queda reflectit en la següent taula:

Concepte	Cost (€)
Cost del personal	8.500,00
Cost lloguer d'equips	1.427,50
Cost reactius i materials	1.179,49
SUBTOTAL	11.106,99
10% Despeses generals	1.110,70
TOTAL	12.217,69

Taula 11. Resum de costos totals del projecte

Per tant, el cost econòmic total per a la realització de l'estudi ha sigut de 12.217,69 €.

CAPÍTOL 7. IMPACTE AMBIENTAL

7. Impacte ambiental

Aquest apartat inclou l'estudi de les emissions de gasos que implica el consum energètic, l'impacte ambiental que suposa la síntesi dels hidrogels, la posterior destrucció dels mateixos i l'eliminació dels residus generats.

7.1. Consum energètic i emissions

La principal despesa ambiental generada en aquest estudi és l'emissió de CO₂ a l'atmosfera a causa del consum elèctric. Per a cada KW·h de consum elèctric es generen 267g de CO₂.

Per tant, si el consum elèctric total durant l'estudi ha estat aproximadament d'uns 420 KW·h s'han generat 112 kg de CO₂.

7.2. Tractament de residus generats

En el moment de destruir els hidrogels es va tenir en compte que són materials que poden desenvolupar fongs i bactèries en la seva estructura. Per això, es van submergir totes les mostres en alcohol durant 1 hora. Posteriorment, es van eliminar com a residus sòlids orgànics.

Els residus que es van generar són, principalment, solucions tampó que es van reciclar separant-les adientment segons si estaven clorades o no. Posteriorment, una empresa externa especialitzada destrueix el contingut dels bidons segons la normativa vigent.

Com a component elèctric consten els Dropsens®, aquests s'han reutilitzant allargant la seva vida útil.

Conclusions

En aquest estudi de recerca s'han obtingut HPGGA amb diferents graus d'entrecreuament i pesos moleculars del polímer. S'han estudiat les propietats d'alliberament dels materials obtinguts mitjançant la incorporació d'un principi actiu soluble model, la DA. Posteriorment, aquests hidrogels s'han dipositat sobre un ESC modificat amb un recobriment de PEDOT. Finalment, s'ha implementat un dispositiu d'alliberació i detecció simultània de DA.

Pel que fa als hidrogels, l'anàlisi dels resultats obtinguts ha permès arribar a les següents conclusions:

- S'han obtingut HPGGA utilitzant AED com agent entrecreuant i 1-([3-dimetilamina]propil) 3-etilcarbodiimida metiliodada (CSA) com a condensant. La caracterització dels hidrogels obtinguts ha permès conèixer la capacitat d'inflament en funció del grau d'entrecreuament, del pes molecular del polímer i de la carbodiimida emprada. Amb un baix entrecreuament (HPGGA-b1.5) l'inflament màxim (medi àcid pH 4.5) és d'un 700% respecte el pes inicial mentre que en el d'alt entrecreuament és d'un 350%. Finalment, s'ha seleccionat el HPGGA-b2.5 per mostrar el conjunt de característiques que millor s'adapten a l'aplicació final desitjada.
- La incorporació de DA als hidrogels s'ha dut a terme pel mètode d'absorció amb una liofilització prèvia de les mostres.
- Els estudis d'alliberació de DA des dels HPGGA en format pastilla han permès observar les corbes d'alliberament en funció del tipus d'HPGGA sintetitzat. Els tipus d'hidrogels s'han agrupat en dos grups segons la velocitat d'alliberació: en el d'alliberació ràpida el procés finalitza en 3 hores mentre que en el d'alliberació lenta es necessiten entre 6 i 8 hores per que s'expulsi el 100% de DA al medi.

Pel que fa al conjunt ESC-PEDOT/GA/HPGGA-b2.5, l'anàlisi dels resultats obtinguts ha permès arribar a les següents conclusions:

- S'ha analitzat el mètode òptim de deposició del film de PEDOT sobre la superfície del sensor. La generació electroquímica és el mètode adient per la deposició del film i per l'estabilitat d'aquests sobre l'elèctrode.

- S'han obtingut HPGGA d'escala reduïda (2.2 x 2.5 mm) respecte els hidrogels inicials mitjançant l'ús de motlles de tefló. Les motlles són totalment necessàries per a que l'hidrogel adquireixi la geometria necessària per encabir-se en la reduïda àrea del WE.
- La incorporació de DA als hidrogels s'ha dut a terme pel mètode d'absorció per equilibri osmòtic (Fick) sense liofilització.
- S'ha determinat la pèrdua d'electroactivitat mostrant uns millors resultats la càrrega coulòmbica catònica amb una pèrdua d'un 4% en 5 cicles en comparació a una pèrdua del 12% en el mateix nombre de cicles. S'ha determinat una bona sensibilitat de $8 \cdot 10^{-5}$ mA/ μ M i límit de detecció de 0,45 μ M.

Futurs estudis

Una vegada assolits els objectius proposats a l'inici d'aquest estudi, s'ha obtingut una visió global del procés de producció del dispositiu i dels punts que calen ser estudiats en més profunditat per tal d'obtenir un dispositiu més eficient. Degut al curt termini de temps disponible per la realització del projecte no s'han pogut dur a terme més assajos i seria bo conèixer més en detall el seu comportament en funció d'altres paràmetres no analitzats. Els principals punts per on es podrien obrir noves vies d'estudi són els següents:

- Millora del procés de recobriment de la superfície del sensor mitjançant PEDOT: durant l'alliberació i detecció simultània de DA en l'ESC va aparèixer un segon pic d'intensitat d'origen desconegut en les CVs. Gràcies als assajos posteriors es va determinar que el senyal es devia al contacte entre la DA i el carboni de l'elèctrode, el qual no havia estat cobert adequadament pel PEDOT.
- Estudi sobre una possible reducció dels temps d'incorporació de DA en els hidrogels: realitzar diferents assajos en la introducció de DA en la xarxa polimèrica en funció d'altres paràmetres que no s'hagin estudiat; per exemple la temperatura o pressió exercida sobre el sistema.
- Optimització del procés de síntesi dels hidrogels sobre la superfície del ESC: millora dels motlles que es van emprar per a que els hidrogels adquirissin la geometria desitjada y reducció dels temps de polimerització.

Agraïments

Durant el trajecte que ha suposat el desenvolupament d'aquest estudi he après tant sobre noves tècniques de treball com de metodologies i he pogut ampliar els meus coneixements sobre els polímers conductors. Per això vull agrair la seva contribució a haver fet possible l'èxit en aquest treball:

A la Dra. Georgina Fabregat per la seva generosa ajuda durant tot el procés, per transmetre'm els seus coneixements i pel seu esperit de millora contínua.

Al Dr. Carlos Alemán per oferir-me l'oportunitat de realitzar aquest treball en el grup de recerca en Nanoenginyeria – IMEM.

A la meva família i amics per recolzar-me en tot moment i en especial en aquesta etapa que finalitza amb el present treball.

Bibliografia

- [1] Yáñez Heras, J. E. (2010). Síntesi de copolímeros de anilina y sus derivados. Aplicaciones en analisis biológicos y medio ambientales. *Biblioteca digital FCEN-UBA*.
- [2] Aradilla Zapata, D. (2008). *Desarrollo de sistemas altamente electroactivos a partir de polímeros conductores convencionales*. Barcelona, Barcelona, Espanya: UPC Commons.
- [3] Fabregat, G., Casnovas, J., Redondo, E., Armelin, E., & Alemán, C. (Febrer de 2014). A rational design for the selective detection of dopamine using conducting polymers. *PCCP*.
- [4] Fabregat, G., Estrany, F., Casas, M. T., Alemán, C., & Armelin, E. (s.f.). Detection of dopamine using Chemically Synthesized Multilayered Hollow Microspheres. *The Journal of Physical Chemistry*.
- [5] Grup d'investigació de Polímers Sintètics: Estructura y Propietats. Polímers biodegradables - PSEP. (s.f.). Hidrogeles para la administración de fármacos mediante inyección en sangre. *No publicat*.
- [6] Hernández, E. (s.f.). Cambios físicos y químicos durante la maduración de cambures y plátanos. *Revista de la Facultad de Agronomía*.
- [7] Hesketh, P., & Misra, D. (2012). Conducting Polymers and their Applications. *The Electrochemical Society*.
- [8] López D., S., & Arancibia S, R. (Maig de 2008). Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Medigraphic*.
- [9] Mandal, A. (18 de Juliol de 2013). *What's dopamine?* Recuperado el Juny de 2016, de News Medical: <http://www.news-medical.net/health/What-is-Dopamine.aspx>
- [10] Mandal, A. (27 de Octubre de 2015). *Dopamine Functions*. Recuperado el Juny de 2016, de News Medical: <http://www.news-medical.net/health/Dopamine-Functions.aspx>
- [11] Moncrieff, J. (2013). *Hablando claro*. Herder.
- [12] Pernia, K., Urdaneta, J., León, O., Oliva Haydeé, & Soto, D. (2013). CINÉTICA DE HINCHAMIENTO DE HIDROGELES SENSIBLES AL pH BASADOS EN ALMIDÓN

Y ÁCIDO ITACÓNICO. *Rev. LatinAm.Metal.Mat* (S6), 9-10.

- [13]Pinzón, N., Espinosa , A., Perilla, J., Hernáez, E., & Katime, I. (2002). Modelamiento del hinchamiento y difusión de solutos en hidrogeles . *Revista Iberoamericana de Polímeros* , 3(2).
- [14]Portilla-Arias , J., Muñoz-Guerra, S., Barradas-Dermitz, D. M., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2012). El ácido Poli(gamma-glutámico): Producción y Aplicaciones Biomédicas . *Biotecnología* , 16 (3).
- [15]Roig Roig, F. (2016). *Hidrogels i materials porosos d'àcid hialurònic enrecreuat com a sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs*. Barcelona, Barcelona, Espanya: Universitat de Barcelona, Facultat de farmàcia.